



# **Universidad Nacional Mayor de San Marcos**

**Universidad del Perú. Decana de América**

**Facultad de Ciencias Biológicas**

**Escuela Profesional de Ciencias Biológicas**

## **La deficiencia en los transportadores de folato (FOLR1 y RFC1) causa cambios epigenéticos que afectan el desarrollo neural y de las células de la cresta neural en embriones de pollo *Gallus gallus***

### **TESIS**

Para optar el Título Profesional de Biólogo Genetista  
Biotecnólogo

### **AUTOR**

Nagif ALATA JIMENEZ

### **ASESORES**

Mg. Gustavo Adolfo SANDOVAL PEÑA (Asesor)

Dr. Pablo Hernán STROBL-MAZZULLA (Coasesor)

Lima, Perú

2019



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

## Referencia bibliográfica

---

Alata, N. (2019). *La deficiencia en los transportadores de folato (FOLR1 y RFC1) causa cambios epigenéticos que afectan el desarrollo neural y de las células de la cresta neural en embriones de pollo Gallus gallus* [Tesis de pregrado, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Ciencias Biológicas, Escuela Profesional de Ciencias Biológicas]. Repositorio institucional Cybertesis UNMSM.

---



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS  
(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ACTA DE SESIÓN PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL DE  
BIÓLOGO GENETISTA BIOTECNÓLOGO  
(MODALIDAD: SUSTENTACIÓN DE TESIS)

Siendo las 09:10 horas del 18 de marzo de 2019, en el Salón de Grados de la Facultad de Ciencias Biológicas y en presencia del jurado formado por los profesores que suscriben, se dio inicio a la sesión para optar al Título Profesional de Biólogo Genetista Biotecnólogo de NAGIF ALATA JIMENEZ.

Luego de dar lectura y conformidad al expediente N° 021-EPGB-2017, el titulando expuso su tesis: "LA DEFICIENCIA EN LOS TRANSPORTADORES DE FOLATO (FOLR1 Y RFC1) CAUSA CAMBIOS EPIGENÉTICOS QUE AFECTAN EL DESARROLLO NEURAL Y DE LAS CÉLULAS DE LA CRESTA NEURAL EN EMBRIONES DE POLLO *Gallus gallus*" y el Jurado efectuó las preguntas del caso calificando la exposición con la nota 19, calificativo: Aprobado con máximos honores.

Finalmente, el expediente será enviado a la Escuela Profesional de Genética y Biotecnología, y al Consejo de Facultad para que se apruebe otorgar el Título Profesional de Biólogo Genetista Biotecnólogo a NAGIF ALATA JIMENEZ y se eleve lo actuado al Rectorado para conferir el respectivo título, conforme a ley.

Siendo las 10:30 horas se levantó la sesión.

Ciudad Universitaria, 18 de marzo de 2019.

Dra. FANNY LAZO MANRIQUE  
(PRESIDENTA)

Mg. GUSTAVO SANDOVAL PEÑA  
(ASESOR)

Mg. CARMEN PANTIGOSO FLORES  
(MIEMBRO)

Mg. EDITH RODRIGUEZ QUISPE  
(MIEMBRO)

“Nuestro miedo más profundo no es que seamos inadecuados. Nuestro miedo más profundo es que somos poderosos sin medida. Es nuestra luz, no nuestra oscuridad que nos asusta más. Nos preguntamos ¿Quién soy para ser brillante, genial, fabuloso, talentoso? De hecho ¿Quién No soy para serlo?”

Marianne Williamson

Del libro “A Return to Love”, 1996

## **DEDICATORIA**

Al Laboratorio de Biología del Desarrollo (LBD), IIB-INTECH; cada lugar tiene algo nuevo que enseñarnos en nuestra vida. Al Dr. Pablo Strobl-Mazzulla, por haberme embebido en el mundo de la epigenética, de la regulación postranscripcional y su apoyo durante este período.

Al Mg. Gustavo Sandoval Peña, por sus valiosos consejos y su apoyo durante esta travesía de mi vida científica.

Asimismo, al profesor Fernando Retuerto, principal alentador de la carrera de Genética y Biotecnología. Nos permitió ver que los obstáculos siempre estarán presentes durante las transiciones nuevas, pero somos nosotros quienes definimos nuestros límites. Además, por su apoyo incondicional para conmigo y mis compañeros durante nuestra vida universitaria.

A la profesora Giovanna Sotil Caycho, por mostrarme el mundo de la regulación génica, por ser la primera persona que confió en mis habilidades como estudiante y persona y haberme iniciado en el mundo de la investigación científica. Así mismo, por ser una amiga y orientadora.

A mi familia, los amo mucho. Gracias por su apoyo incondicional, por sus consejos en los momentos más difíciles de mi vida, por su aliento en mi trayectoria de estudiante y su amor.

A todas las personas que hicieron posible la realización de esta tesis de una u otra manera, especialmente a Diana Castañeda, Luisa Arias, Juan Fernandino, Omar Moreno y Estefanía Sánchez compañeros de laboratorio que me dieron buenos consejos.

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi padre Alejandro Alata, por mostrarme el lado intelectual de la vida. Gracias por fomentar mi formación académica y apoyarme durante toda mi vida.

A mi madre Lidia Jimenez, por enseñarme con su experiencia que somos una gota en un mar de oportunidades. La vida nos da las herramientas y nosotros debemos utilizarlas.

A mi hermana Shady, por estar siempre a mi lado, mostrarme la realidad tal como es y darme un aliento de apoyo cuando más lo necesitaba. Gracias por estar siempre para mí.

A mi familia entera, por permitirme compartir hermosos momentos a lo largo de mi vida con ustedes.

A mi colegio “Reyna del Santísimo Rosario”. Gracias por enseñarme valores, por permitirme conocer a mis amigos y llenar mi vida de amor.

Al profesor Fernando Levado, la profesora Leonor Valdez, por sus enseñanzas y consejos.

A todos mis amigos de la universidad, del colegio, del IIB-INTECH, de la Alianza française, a todos. Compartimos muchos momentos gratos que siempre serán recordados.

A todos mis profesores de la carrera, quienes permitieron que pueda llegar a donde estoy. La vida nos pone diferentes guías durante nuestra corta existencia y los profesores son uno de esos guías. Gracias.

A todas las personas que conocí en el IIB-INTECH. Diana, Luisa, Omar, Martin, Martha, Natalia, Onias. Gracias por recibirme con los brazos abiertos y permitirme ser parte de su vida.

## ABREVIATURAS

°C	Grados Centígrados
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
ADNc	ADN complementario
ARNm	ARN mensajero
BSA	Albúmina Sérica Bovina
BMP	<i>Bone Morphogenetic Protein</i> (Proteína Morfogenética del Hueso)
CHAPS	3-[(3-Colamidopropil)- dimetilamonio]-propano sulfonato
CHAPS-DEPC	CHAPS preparado con agua tratado con DEPC
DEPC	Dietilpirocarbonato
DNMT	ADN metiltransferasa
dNTP	Desoxi ribonucleótidos trifosfato
FGF	<i>Fibroblast Growing Factor</i> (Factor de Crecimiento Fibroblástico)
g	Gramos
h	Horas
HCl	Ácido Clorhídrico
HIS	Hibridación <i>in situ</i>
KCl	Cloruro de Potasio
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Fosfato diácido de potasio
L	Litro
M	Molar
mA	Miliamperios
MAB	<i>Maleic Acid Buffer</i> (solución amortiguadora de ácido maleico)
MABT	MAB con 0.1% de Tween20
MeOH	Metanol
MgCl <sub>2</sub>	Cloruro de Magnesio
mL	Mililitro
mM	Milimolar
Na <sub>2</sub> CO <sub>2</sub>	Carbonato de sodio
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Fosfato disódico



NaCl	Cloruro de sodio
NaHCO <sub>3</sub>	Bicarbonato de sodio
NaOH	Hidróxido de sodio
nt	Nucleótido
pb	Pares de base
PBS	<i>Buffer</i> Fosfato Salino
PBSW	PBS y 0.1% tween20
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reacción en cadena de la polimerasa)
pH	Potencial de Hidrogeno
RNasa	Ribonucleasa
rpm	Revoluciones por minuto
RT	<i>Reverse Transcription</i> (Transcripción reversa)
SAM	S-Adenosilmetionina
SDS	Sodio Dodecil Sulfato
SFB	Suero fetal bovino
SSC	Solución salina de citrato de sodio
TBE	Tris/Borato/EDTA
TEMED	Tetrametil etileno diamino
Tris	Tris hidroximetil aminometano
U	Unidades
uL	Microlitro
UV	Ultravioleta
V	Voltios
WNT	Wingless e int (siglas en inglés)

## INDICE GENERAL

1.- Introducción .....	1
2.- Marco Teórico .....	4
2.1.- Desarrollo Neural y Cresta Neural .....	4
2.1.1 Tubo neural .....	4
2.1.2 Cresta neural .....	6
2.2.- Folato y Desarrollo .....	11
2.3.- Epigenética en el desarrollo .....	13
2.3.1 Epigenética .....	13
2.3.2 Epigenética y desarrollo de las células de la Cresta Neural .....	16
3.- Objetivos .....	18
3.1.- Objetivo general .....	18
3.2.- Objetivos específicos .....	18
4.- Hipótesis de investigación .....	18
5.- Materiales y Métodos .....	19
5.1.- Material biológico .....	19
5.2.- Materiales de laboratorio .....	19
5.2.1.- Reactivos .....	19
5.2.2.- Equipos .....	21
5.3.- Métodos .....	22
5.3.1.- Morfolino .....	22
5.3.2.- Electroporación .....	23
5.3.3.- Eficacia del morfolino .....	25
5.3.3.1.- PCR del ADNc del transportador RFC1 .....	26
5.3.3.2.- PCR del ADNc del receptor FolR1 .....	27
5.3.4.- Metilación global del ADN y ARN .....	29
5.3.4.1.- Metilación de ADN .....	29
5.3.4.1.1.- Dot Blot de ADN contra 5mC .....	30
5.3.4.1.2.- Análisis de la cantidad de ADN metilado .....	30
5.3.4.2.- Metilación de ARN .....	32
5.3.4.2.1.- Dot Blot de ARN contra m6A .....	32
5.3.4.2.2.- Análisis de la cantidad de ADN	

metilado .....	33
5.3.5.- Patrón de expresión del marcador de células de la Cresta Neural <i>Sox10</i> y el marcador neural <i>Sox2</i> .....	33
5.3.6.1.- Hibridación In Situ (HIS) .....	34
5.3.7.- Inmunofluorescencia de cortes de HIS .....	36
6.- Resultados .....	39
6.1.- Eficacia del morfolino .....	39
6.1.1.- Determinación de la eficiencia del morfolino RFC1spMO .....	39
6.1.2.- Determinación de la eficiencia del morfolino FolR1spMO .....	39
6.2.- Metilación global de ADN y ARN .....	41
6.2.1.- Disminución de la metilación global de ADN .....	41
6.2.2.- Disminución de la metilación global de ARN .....	43
6.3.- Efecto de la deficiencia de FolR1 y RFC1 en el desarrollo de la Cresta Neural .....	45
6.4.- Efecto de la deficiencia de FolR1 y RFC1 en la especificación de las células neurales .....	47
7.- Discusión .....	50
7.1.- La deficiencia de los transportadores de folato (FolR1 y RFC1) afecta la metilación del ADN y ARN .....	50
7.2.- La pérdida de función de los transportadores de folato inducen un destino neural a expensas de las células de la cresta neural .....	52
8.- Conclusiones .....	55
9.- Recomendaciones .....	55
10.- Referencias Bibliográficas .....	56
11.- Material Suplementario (ANEXOS) .....	62
11.1.- ANEXO I.- composición de soluciones .....	62
11.2.- ANEXO II.- ImageJ: imágenes y valores de cuantificación ADN y ARN .....	65
11.2.1.- Cuantificación de ADN .....	65
11.2.2.- Cuantificación de ARN .....	68

## RESUMEN

El desarrollo neural ocurre mediante el proceso de neurulación originando el Sistema Nervioso Central y la médula espinal. Durante este proceso las células de la cresta neural (CCN) son especificadas en la región más dorsal del tubo neural; posteriormente, las CCN delaminan del epitelio neural, migran a diferentes regiones del embrión y se diferencian en diversos tipos celulares. Defectos en el desarrollo del tubo neural y de las CCN generan desórdenes congénitos como espina bífida, encefalocelia, y neurocristopatías (paladar-labio hendido, albinismo, entre otras). Una vitamina importante durante el desarrollo embrionario temprano es el folato, el cual se encuentra en el sistema circulatorio en forma de 5-metiltetrahidrofolato (5-MTHF) e ingresa a la célula por medio del receptor de membrana FOLR1 y el transportador RFC1. El 5-MTHF participa en la síntesis de nucleótidos y en la generación de S-adenosilmetionina (SAM) para la metilación de ácidos nucleicos y proteínas. La metilación de ácidos nucleicos y proteínas son importantes mecanismos de regulación epigenética durante el normal desarrollo embrionario de los vertebrados. Considerando lo dicho nos planteamos como objetivo determinar el efecto epigenético de la deficiencia del folato en el desarrollo del tubo neural y de las CCN. Para esto realizamos la pérdida de función del receptor FOLR1 y transportador RFC1 mediante el uso de los morfolinós FolR1spMO y RFC1spMO en embriones de pollo. Posteriormente evaluamos los niveles de 5mC en el ADN y 6mA en el ARN mediante *dot blots*, observando una clara disminución en ambas marcas epigenéticas. Nuestro análisis de expresión del marcador de CCN *Sox10* en embriones inyectados evidenció una disminución en el número de CCN. Adicionalmente, el marcador neural *Sox2* presentó una expresión ectópica en el territorio de las CCN. Estos resultados muestran que la deficiencia de folato afecta la metilación global del ADN y ARN generando un cambio en el destino celular de los progenitores de las CCN hacia un destino neural. Los resultados obtenidos en esta tesis pueden sentar las bases para

un mejor entendimiento y desarrollo de tratamientos capaces de prevenir o disminuir las anomalías ocasionadas por la deficiencia de folato en mujeres embarazadas.

PALABRAS CLAVES: folato, cresta neural, epigenética, *Sox10*, *Sox2*.

## ABSTRACT

Neural development occurs through the process of neurulation where the Central Nervous System and the spinal cord will be formed. During this process neural crest cells (NCCs) are specified at the most dorsal region of the neural tube; later, NCCs delaminate from neural epithelium, migrate to different regions of embryo and differentiate into several cellular types. Defects in neural tube and NCCs development lead to serious congenital disorders such as spina bifida, encephalocele and neurocristopathies (clef lip-palate, albinism, among others). One important vitamin during early embryo development is folate, which is found in the circulatory system in the form of 5-methyltetrahydrofolate (5-MTHF) and enters into cells via the membrane receptor FolR1 and the transporter RFC1. 5-MTHF is involved in nucleotide synthesis and synthesis of S-adenosylmethionine (SAM) for nucleic acid and proteins methylation. This methylation of nucleic acids and proteins are important mechanisms of epigenetic regulation during normal embryonic development of vertebrates. Considering this, we set ourselves the objective of determining the epigenetic effect of folate deficiency on the development of neural tube and NCCs. For this, a decrease in folate levels was generated by a deficiency of the receptor FolR1 and the transporter RFC1 by morpholines FolR1spMO and RFC1spMO in chick embryos. Subsequently, the levels of 5mC in the DNA and 6mA in the RNA were evaluated by dot blots, a decrease was observed in both epigenetic marks. Our analysis of the expression of NCC marker Sox10 showed a decrease of the number of NCCs in injected embryos. Additionally, the neural marker Sox2 presented an ectopic expression in neural crest territories. These results show that folate deficiency affects global methylation of DNA and RNA leading to a change in cellular fate of NCC progenitors to neural fate. The results obtained in this thesis can lay the foundations of possible treatments that allow the regulation of the epigenetic alterations that occur in the embryonic development.

**KEYWORDS:** folate, neural crest, epigenetic, *Sox10*, *Sox2*.

## 1.- INTRODUCCIÓN

La neurulación es el proceso a partir del cual se forma el Sistema Nervioso Central y la médula espinal. Durante este proceso se da la inducción de la placa neural, la elevación de los pliegues neurales y la fusión de los mismo formando el tubo neural (Sasai, Lu, Steinbeisser, & De Robertis, 1995). Otro evento importante que ocurre de manera conjunta con la neurulación, es la formación de las células de la cresta neural (CCN), la cual es una población transitoria de células que se especifican en los bordes dorsales de los pliegues neurales y luego delaminan del epitelio para migrar grandes distancias y diferenciarse en diversos tipos celulares. Estas células tienen la capacidad de diferenciarse en melanocitos, condrocitos y osteocitos que forman estructuras craneofaciales, células gliales y neuronales del sistema nervioso periférico, células cardíacas, células de la médula suprarrenal, entre otras (Nieto, 2001).

Los defectos en el desarrollo del tubo neural y de las CCN conllevan a la aparición de desórdenes congénitos serios. Dentro de los primeros está la espina bífida, la craneorraquisquisis, la encefalocelia; y los defectos en el desarrollo de las CCN (neurocristopatías), los cuales generan defectos craneofaciales (paladar y labio hendido), afecciones cardíacas, el síndrome de Waardenburg, albinismo entre otros.

El folato – y su forma sintética, el ácido fólico – es una vitamina hidrosoluble esencial para los vertebrados y es obtenida a partir de la dieta (Bohnsack & Hirschi, 2004). Esta vitamina se encuentra en el sistema circulatorio en forma de 5-metiltetrahidrofolato (5-MTHF) e ingresa a la célula por medio del receptor de membrana FOLR1 y el transportador RFC1. Una vez ingresado a la célula, es utilizado como un cofactor esencial en la síntesis de nucleótidos y en la generación del principal donador de grupos metilo (S-adenosilmetionina, SAM) para la metilación de ácidos nucleicos y proteínas (Crider, Yang, Berry, & Bailey, 2012), siendo este último uno de los principales mecanismos epigenéticos involucrados en la regulación de la transcripción de los genes del desarrollo.

La deficiencia de folato durante el desarrollo embrionario en humanos conlleva a la aparición de serios defectos en el cierre del tubo neural (espina bífida) y diversas neurocristopatías (deformaciones craneofaciales y defectos cardíacos) (Antony & Hansen, 2000; Beaudin & Stover, 2007; Blom, Shaw, den Heijer, & Finnell, 2006; Li, Shi, Sun, Zhang, & Mao, 2011) como consecuencia de defectos en la especificación/migración de las células de la cresta neural. En humanos, la suplementación con ácido fólico durante las semanas previas y posteriores al embarazo disminuye la frecuencia de defectos en el tubo neural y las neurocristopatías en un 70 a 80% (Obican, Finnell, Mills, Shaw, & Scialli, 2010; van Rooij et al., 2004). Por el contrario, las mujeres embarazadas que tomaban medicamentos que interferían o antagonizaban con el metabolismo del folato (tales como aminopterín, carbamazepina, trimetoprima, metotrexato y ácido valproico) presentaron una mayor incidencia de tener hijos con espina bífida o neurocristopatías severas (Blom et al., 2006; Finnell, Greer, Barber, & Piedrahita, 1998).

La epigenética es el mecanismo por el cual el ambiente influye sobre la expresión de diferentes genes, estos cambios se dan a través de procesos epigenéticos.. Los procesos epigenéticos que alteran de manera estable los patrones de expresión génica incluyen la metilación de citosinas, las modificaciones post-traduccionales de las histonas, la remodelación de la cromatina y los mecanismos basados en ARN no codificantes. En los últimos años han surgido diversos trabajos que demuestran la importancia de las modificaciones epigenéticas en el desarrollo normal del tubo neural y de las células de la cresta neural (Hu, Strobl-Mazzulla, Sauka-Spengler, & Bronner, 2012; Rada-Iglesias & Wysocka, 2011; Strobl-Mazzulla & Bronner, 2012; Strobl-Mazzulla, Marini, & Buzzi, 2012; Strobl-Mazzulla, Sauka-Spengler, & Bronner-Fraser, 2010). En este sentido, el folato, como cofactor necesario para la formación de SAM, se encontraría posicionado como un componente limitante para el establecimiento de los patrones de metilación de ADN e histonas necesarios para la correcta expresión de



genes y microARNs que regulen el normal desarrollo del tubo neural y de las células de la cresta neural.

Diversos estudios realizados *in vivo* e *in vitro* han demostrado una correlación directa entre la deficiencia de folato y una hipometilación genómica generalizada (Bohnsack & Hirschi, 2004; Choi, Friso, Keyes, & Mason, 2005; Pufulete et al., 2005). Sin embargo, hasta el momento no existen estudios que determinen los mecanismos epigenéticos implicados en los defectos específicos ocasionados por la deficiencia de folato sobre el desarrollo del tubo neural y las células de la cresta neural. En este contexto, entender como la deficiencia de folato es capaz de afectar el desarrollo neural y de las células de la cresta neural permitirá comprender la etiología de las enfermedades asociadas; y en el futuro poder generar herramientas tendientes a detectar y prevenir las mismas.

## 2.- MARCO TEORICO

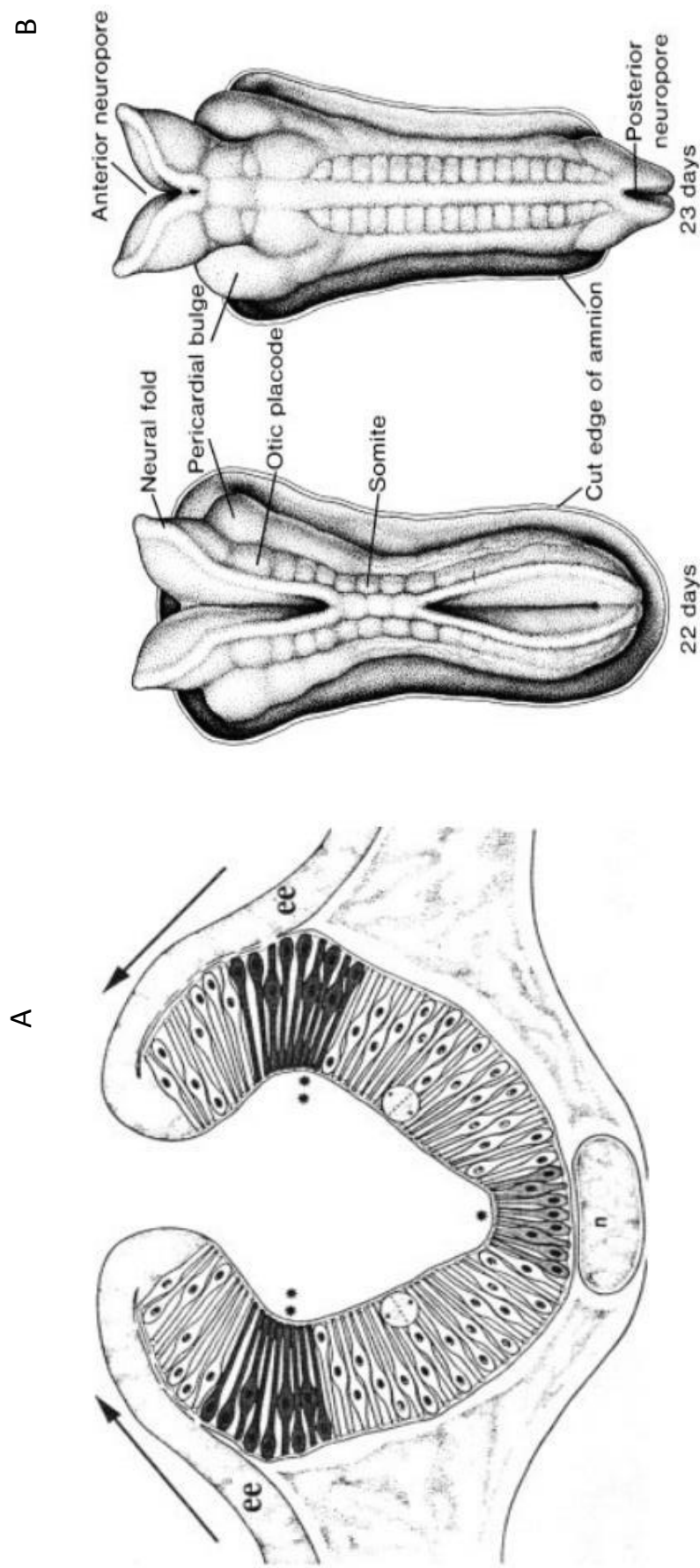
### 2.1 Desarrollo Neural y Cresta neural

#### 2.1.1 Tubo neural

Durante la embriogénesis, el desarrollo neural ocurre mediante un proceso conocido como neurulación a partir del cual se formará el Sistema Nervioso Central y la médula espinal. Este proceso inicia con la inducción de placa neural, la elevación de los pliegues neurales y la posterior fusión de los mismos (Sadler, 2005; Sasai et al., 1995). Sin embargo, este proceso es complejo y envuelve numerosos pasos en donde a menudo las alteraciones resultan en anomalías que en conjunto se conocen como defectos del tubo neural (DTN) (Blom, 2009).

Durante el desarrollo neural, el epiblasto no migratorio del disco bilaminar (células epiblasticas e hipoblasticas) formará la placa pre-cordal y la notocorda. La placa pre-cordal y la notocorda iniciaran el proceso de neurulación por medio de la formación del tubo neural desde la capa superior de las células ectodermales (Sadler, 2005) (**Fig. 1**). La inducción de la placa neural ocurre como consecuencia de la inhibición de señales que inducen la formación de la epidermis tales como los BMPs (noggin y chordin) (Sasai et al., 1995) y la expresión de FGF (Wilson, Graziano, Harland, Jessell, & Edlund, 2000).

Una vez que la placa neural ha sido inducida, sus bordes laterales se elevan en los pliegues neurales los cuales se moverán hacia la línea media para fusionarse. Este proceso depende de la elevación de los pliegues neurales y su posterior fusión en la línea media (Colas & Schoenwolf, 2001; Keller et al., 2000), donde la presencia, variación, aumento, disminución de los microfilamentos (actina y miosina), microtúbulos y los cambios en las tasas mitóticas permiten el proceso de neurulación *per se*. Estas fuerzas intrínsecas del ectodermo no neural contribuyen de manera significativa en la curvatura de los pliegues neurales por

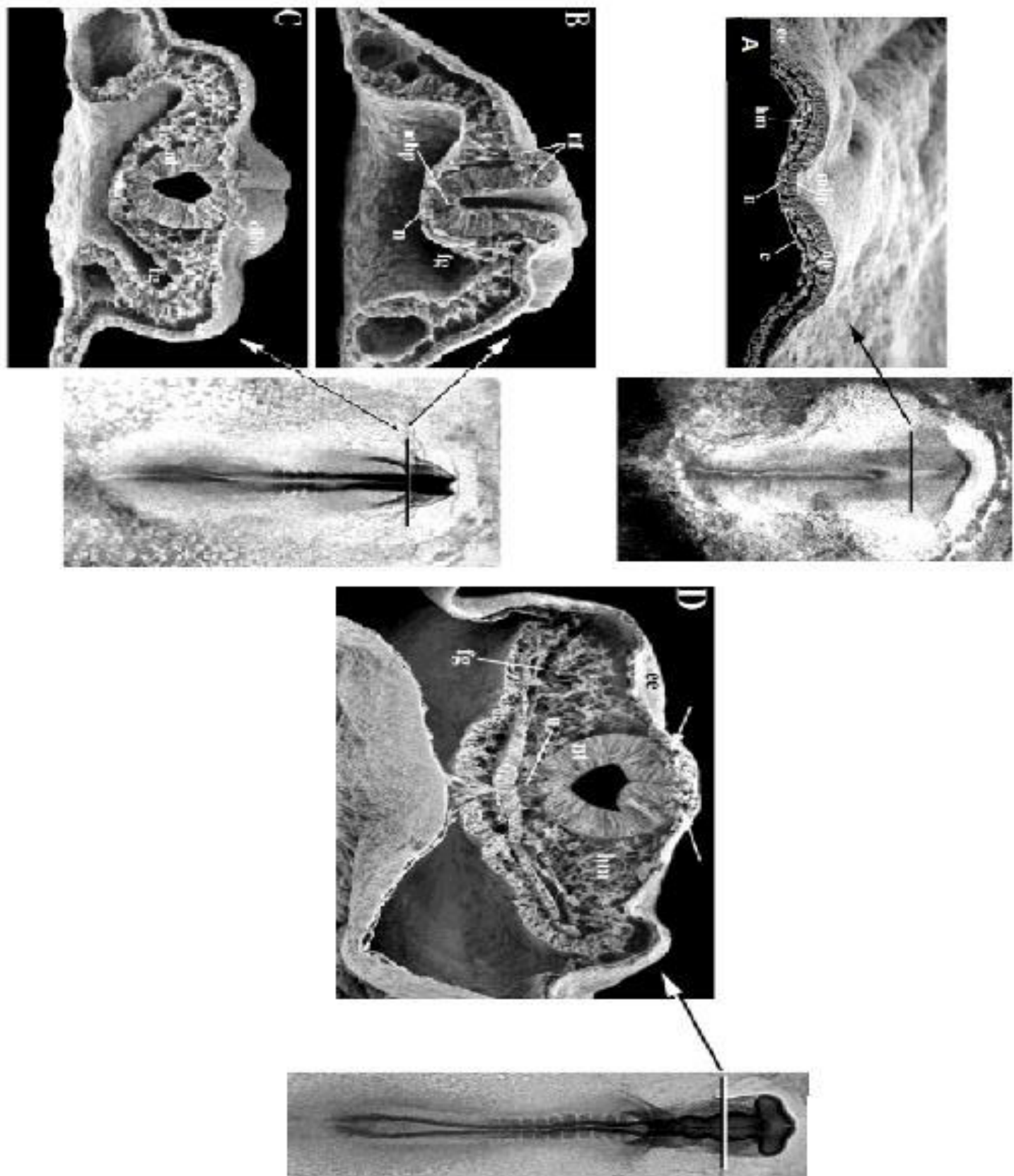


**Figura 1.- Vista transversal de los pliegues neurales. A.-** Los pliegues neurales se elevan y son empujados hacia la línea media por el ectodermos generando una zona de bisagra media (\*\*) y una zona de bisagra lateral (\*). B.- Cierre del tubo neural. ee: ectodermo, n: notocorda. Sadler, T. W. (2005). "Embryology of neural tube development." *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 135C(1): 2-8.

medio de la expansión del ectodermo (Lawson, Anderson, & Schoenwolf, 2001), el cual empuja los pliegues hacia la línea media. Finalmente, los pliegues se encuentran en la línea media donde se fusionan a través de la cubierta de su superficie celular la cual actúa como un adhesivo para mantener los pliegues juntos hasta que los contactos permanentes célula-célula puedan ser establecidos (**Fig. 2**). Durante el desarrollo neural, la expresión del factor de transcripción *Sox2* define la especificación de las células madre embrionarias hacia un destino de neuro-ectodermo, así este factor induce el destino neural y potencia la diferenciación neural por medio de la represión de reguladores claves de otros linajes celulares. *Sox2* también permite la auto-renovación de los progenitores neurales al ser un factor permanente de esta línea celular y presentar un alta expresión en dichas células (Thomson et al., 2011; S. Zhang & Cui, 2014; S. Zhao, Nichols, Smith, & Li, 2004).

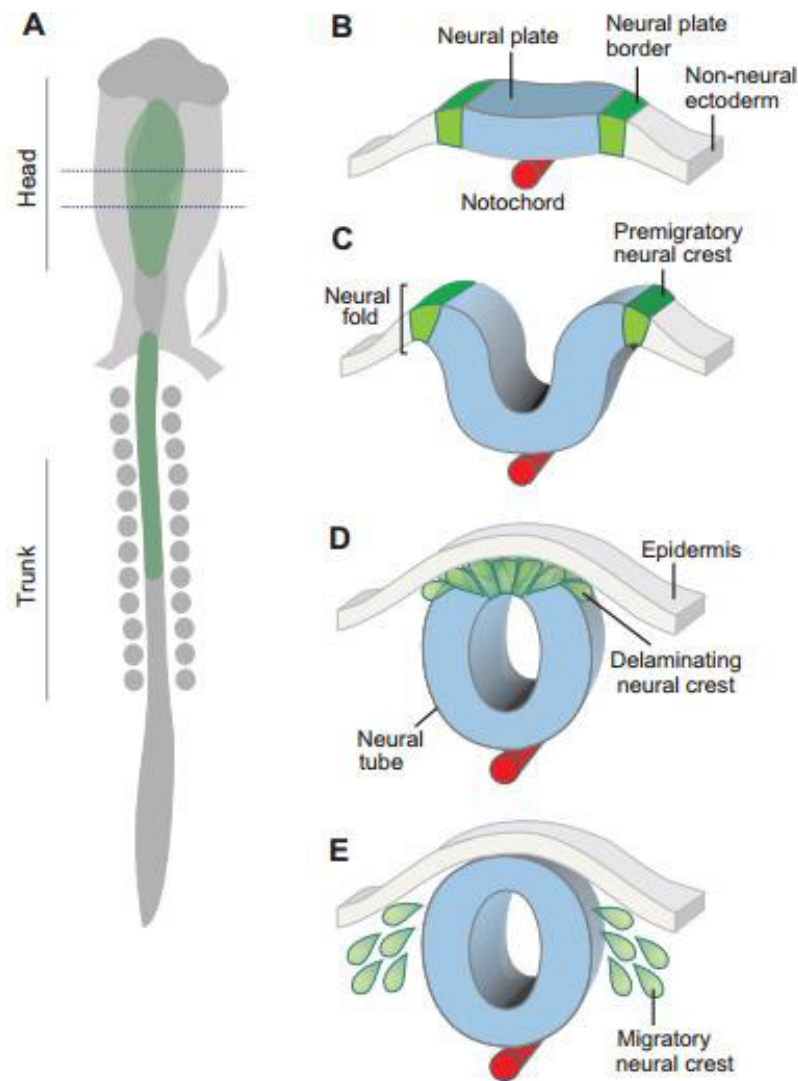
### **2.1.2 Cresta Neural**

La cresta neural es una población transitoria de células, originada entre la placa neural y el ectodermo no-neural que dará lugar a la epidermis. La cresta neural es considerada uno de los tejidos más fascinantes presentes en vertebrados ya que da origen a diversos tipos celulares. Las mismas son especificadas en el tubo neural dorsal y luego deben delaminar de dicho epitelio para así migrar largas distancias a lo largo de vías definidas y finalmente alcanzar su destino en donde se diferenciarán (Nieto, 2001) (**Fig. 3**). Durante este proceso, las células de la cresta neural pierden su carácter epitelial y adquieren características mesenquimatosas, transformándose en células migratorias (Basch, Garcia-Castro, & Bronner-Fraser, 2004). Estas células generarán diversos tipos celulares y formarán parte de diversos tejidos como es el caso de la mayoría de los huesos



**Figura 2.-Desarrollo del tubo neural.** Se observa el desarrollo del tubo neural mediante microscopia electrónica desde la formación del borde neural hasta la fusión de los pliegues neural en la línea media. A.- Estadío de formación y elevación del borde de la placa neural. B.- Elevación de los pliegues neurales hacia la línea media. C.- Fusión de los pliegues neurales en la línea media. D.- Formación completa del tubo neural y delaminación de las células de la cresta neural (flechas). dhlp: punto de bisagra dorsolateral, e: ectodermo, ee: epitelio ectodermal, fg: estómago anterior, hm: mesodermo de la cabeza, mhp: punto de bisagra media, n: notocorda, nf: pliegues neurales, np: placa neural. Colas, J. F. and G. C. Schoenwolf (2001). "Towards a cellular and molecular understanding of neurulation." *Dev Dyn* **221**(2): 117-145.

y cartílagos craneofaciales, células neuronales y gliales del sistema nervioso periférico, células medulares de la glándula suprarrenal y todos los melanocitos del cuerpo (Hall, 2008). Debido a la potencialidad para generar diversos tipos celulares y a reunir características de una capa germinal (Hall, 2000, 2008), se ha propuesto considerarla como la cuarta capa germinal a pesar de tener un origen ectodérmico.



**Figura 3.-Desarrollo de la cresta neural.** A. Vista esquemática de un embrión de pollo en estadio de 10 somitas. B. Desarrollo inicial de la cresta neural durante la gástrula (especificación del borde la placa neural). C. A medida que se forma el tubo neural las células progenitoras de la cresta neural se especifican en la parte dorsal de los pliegues dorsales. D. Después de la especificación las células de la cresta neural sufren una transición epitelio mesénquima y delaminan del tubo neural. E. Migración de las células de la cresta neural hacia diversos destinos por diferentes vías para generar múltiples tipos celulares. Simoes-Costa, M. and M. E. Bronner (2015). "Establishing neural crest identity: a gene regulatory recipe." *Development* **142**(2): 242-257.

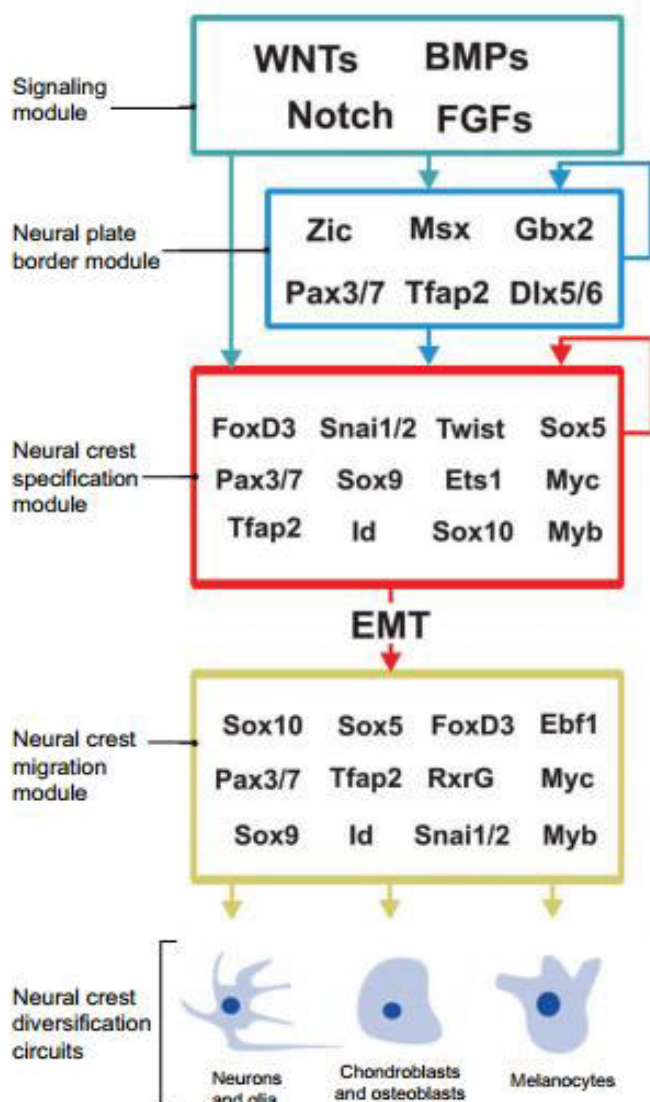
### ***Especificación y regionalización de las células de la cresta neural***

Las células de la cresta neural son inducidas en la capa germinal ectodermal durante la gastrulación e inicialmente residen en el territorio del borde de la placa neural, el cual se posiciona en los límites laterales de la placa neural. La inducción de este borde se da por un gradiente de factores inductores e inhibitorios, tales como WNT y BMP desde las regiones laterales y media del embrión (Groves & LaBonne, 2014). La especificación de las células de la cresta neural inicia cuando las células del borde de la placa neural comienzan la expresión de los genes especificadores del borde de la placa neural tales como *Tfap2*, *Msx1*, *Zic1*, *Gbx2*, *Pax3/7*, *Dlx5/6*, *Gata2/3*, *Foxi1/2* y *Hairy2* (Khudyakov & Bronner-Fraser, 2009; Meulemans & Bronner-Fraser, 2004) - este grupo de células son conocidos como progenitores de la cresta neural. Los progenitores de la cresta neural comienzan a expresar diferentes genes que son conocidos como especificadores de la cresta neural: *Sox10*, *FoxD3*, *Snai1/2*, *Twist*, *Sox9*, *Myc*, *Myb*, *Ets1*, *Id* (Betancur, Bronner-Fraser, & Sauka-Spengler, 2010; Khudyakov & Bronner-Fraser, 2009); permitiendo definir este grupo de células como células de la cresta neural.

El proceso de especificación de las células de la cresta neural está altamente regulado e inicia con la definición del borde de la placa neural. Es así que la regulación de estos especificadores de la cresta neural está dada por especificadores del borde de la placa neural. Entre los diferentes reguladores se tiene a *Pax3/7* y *Msx1* los cuales a su vez regulan la expresión de *FoxD3* y *Ets1* (Simoes-Costa & Bronner, 2015); mientras que *Pax3/7*, *Msx1* y *Zic1* regulan la expresión de los genes *SoxE* (Sauka-Spengler & Bronner-Fraser, 2008). Al mismo tiempo los genes especificadores de la cresta neural se regulan positivamente de manera cruzada unos a otros para mantener la especificación de las células (**Fig. 4**).



Durante la embriogénesis pueden ocurrir alteraciones en el desarrollo normal de diferentes estructuras u órganos. De la misma manera, las diferentes etapas del desarrollo de las células de la cresta neural (inducción, especificación, migración y diferenciación) pueden ser afectadas ocasionando diversas afecciones. El conjunto de estas enfermedades se conoce como neurocristopatías, término que fue introducido por Bolande para denotar desordenes que envuelven derivados defectuosos de la cresta neural (Benish, 1975). Hay diversas neurocristopatías que afectan diferentes sistemas y Bolande las dividió en dos grupos generales: disgenéticas y neoplásicas (Benish, 1975; Bolande, 1997). Las neurocristopatías disgenéticas son esencialmente malformaciones congénitas que resultan de desarreglos de la migración, colonización o cito-diferenciación de las células de la



**Figura 4.-Desarrollo de la Cresta Neural.** Red reguladora génica que controla el desarrollo de las células de la cresta neural. Desde el proceso de formación del borde de la placa neural hasta la diversificación celular. Simoes-Costa, M. and M. E. Bronner (2015). "Establishing neural crest identity: a gene regulatory recipe." *Development* **142**(2): 242-257.

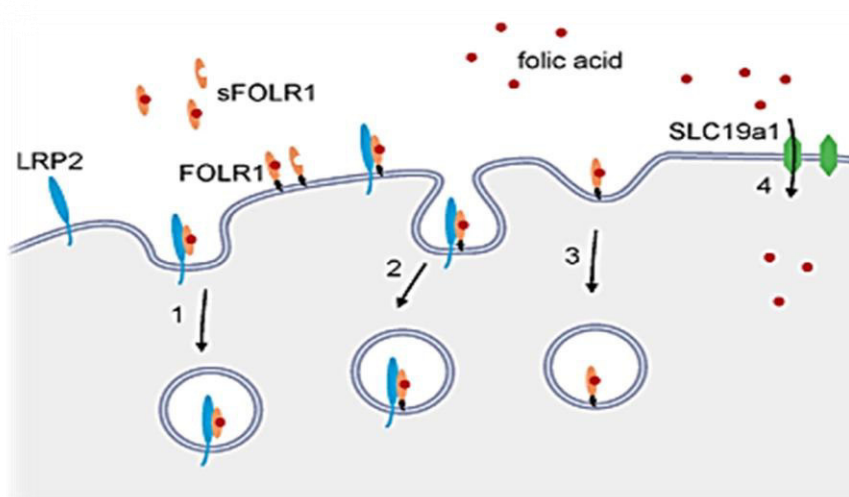


cresta neural. Las neurocristopatías son verdaderos neoplasmas, hiperplasias, neoplásicas o hamartomas (proliferación de células diferenciadas maduras no nativas del tejido) simple y complejas. Adicionalmente, las neurocristopatías simples afectan a un solo tejido, como es el caso del megacolon agangliónico (Enfermedad de Hirschprung) o el Síndrome de Riley-Day, mientras que las neurocristopatías complejas afectan a varios tejidos como en la neurofibromatosis, la melanosis neurocutánea y el síndrome de Waardenburg (Sadler, 2005; Wilkie & Morriss-Kay, 2001).

## **2.2 Folato y desarrollo**

El folato – y su forma sintética, el ácido fólico – es una vitamina hidrosoluble esencial para los vertebrados y es obtenida a partir de la dieta (Bohnsack & Hirschi, 2004). El folato una vez ingerido, es hidrolizado en el intestino para luego entrar al sistema circulatorio en donde se encuentra mayormente bajo la forma de 5-metiltetrahydrofolato (5-metilTHF) y posteriormente ingresar a las células. Una vez que ha ingresado a las células, el folato interviene en la síntesis de purinas y en la síntesis de S-adenosil metionina (SAM), el cual es utilizado como sustrato de metiltransferasas de ADN, ARN e histonas, siendo estas una de las principales marcas epigenéticas que regulan la expresión génica (Crider et al., 2012). El ingreso del folato a las células es mediado principalmente por el receptor FOLR1 y el transportador RFC1 (SLC19A1) (Finnell et al., 1998; Iskandar et al., 2010; Kur, Mecklenburg, Cabrera, Willnow, & Hammes, 2014) (**Fig. 5**). El transportador RFC1 presenta una baja afinidad por el folato, pero es responsable de la mayor parte del transporte a través de la membrana. Por otro lado, los receptores de folato presentan 3 isoformas siendo FOLR1 la más estudiada y la que presenta mayor afinidad por el folato (Kelemen, 2006).

Diferentes estudios han mostrado una relación indirecta entre la insuficiencia de folato con los defectos en el desarrollo neural, entre los que se destacan la craneorraquisquisis, la anencefalia, la espina bífida y la encefalocele, entre otras. También se la ha asociado a diversas neurocristopatías debido a defectos en la especificación, migración y diferenciación de las células de la cresta neural (Antony & Hansen, 2000; Beaudin & Stover, 2007; Blom et al., 2006). En humanos, la suplementación con ácido fólico durante las semanas previas y posteriores al embarazo disminuye la frecuencia de defectos en el tubo neural y algunas neurocristopatías en un 70-80% (Obican et al., 2010; van Rooij et al., 2004). Sin embargo, surge la pregunta de qué hace al tejido neural y a las células de la cresta neural particularmente vulnerables a la deficiencia de folato. En este sentido diversos estudios, incluyendo los obtenidos por el grupo del Dr. Pablo Strobl-Mazzulla (IIB-Intech, Argentina) utilizando embriones de pollo, han demostrado que FOLR1 y RFC1 se expresan particularmente en estos tejidos durante el desarrollo temprano (Li et al., 2011; Maddox et al., 2003; Zhu et al., 2007). En este contexto, la deficiencia de folato se relaciona con la presencia o ausencia de los transportadores que permiten su ingreso dentro de la célula. Por otro lado, la inactivación del gen *Folr1* y la eliminación del gen *Rfc1* resultan letales durante el desarrollo embrionario (R. Zhao et al., 2001).



**Figura 5.-Ingreso de Folato en la célula.** El folato ingresa a la célula por medio del transportador RFC1 (también llamado SLC19a1) y el receptor de membrana FolR1 para después ingresar en el ciclo del folato. Kur, E., N. Mecklenburg, R. M. Cabrera, T. E. Willnow and A. Hammes (2014). "LRP2 mediates folate uptake in the developing neural tube." *J Cell Sci* **127**(Pt 10): 2261-2268.

En modelos de ratón *Rfc1*<sup>-/-</sup>, la suplementación materna de ácido fólico rescata la letalidad del genotipo (R. Zhao et al., 2001), de igual modo ratones *Folr1*<sup>-/-</sup> son rescatados con dosis crónicas de ácido fólico (Piedrahita et al., 1999) previniendo la presencia de malformaciones del tubo neural. Estos datos muestran un rol importante del folato durante el desarrollo neural y de las células de la cresta neural, así como en la prevención de los defectos asociados al desarrollo anómalo de los mismos (Antony & Hansen, 2000; Blom, 2009; Finnell et al., 1998).

## **2.3 Epigenética en desarrollo**

### **2.3.1 Epigenética**

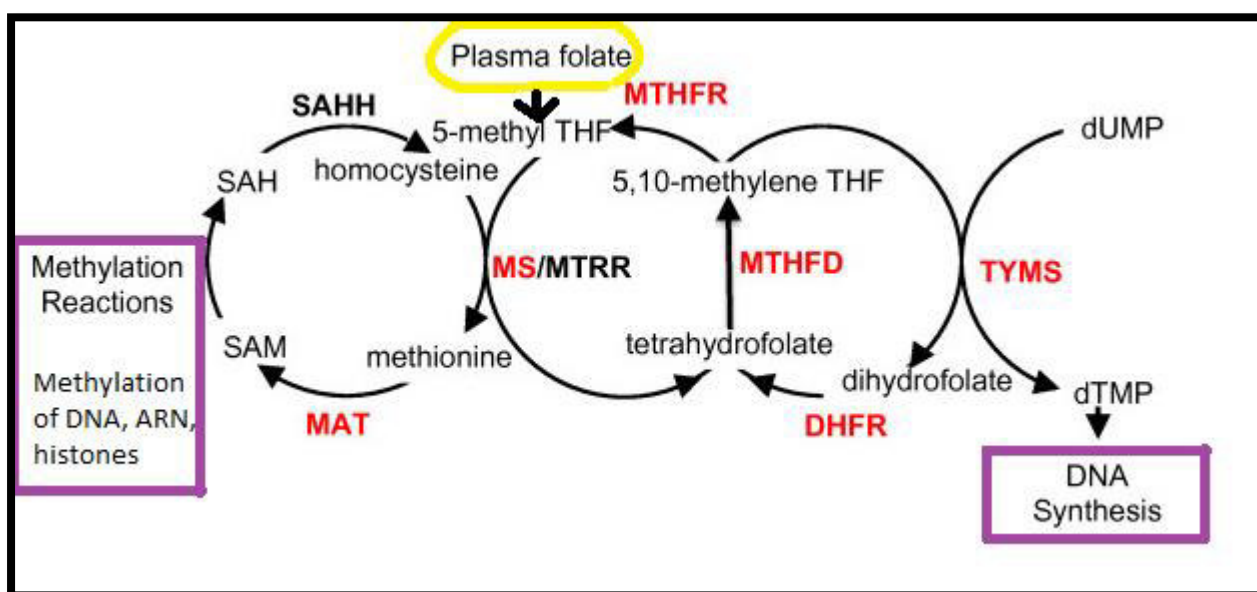
La epigenética es el estudio de los cambios heredables en el fenotipo o en la expresión de genes que no son el resultado de cambios en la secuencia primaria del ADN (Fazzari & Grealley, 2010; Suzuki & Bird, 2008). Algunos de los mecanismos más conocidos y estudiados implican las metilaciones de ADN, histonas y ARNs (Kundu & Peterson, 2009). Estos mecanismos regulatorios modulan la estructura de la cromatina y contribuyen a la regulación de los mayores procesos moleculares en el núcleo que incluyen la transcripción y el procesamiento de ARN. Estas metilaciones dependen principalmente del donador universal de grupos metilos S-adenosilmetionina (SAM), cuya disponibilidad depende exclusivamente de la presencia de folato intracelularmente (Lee et al., 2012). **(Fig. 6)**

La metilación del ADN es una modificación covalente del ADN genómico a nivel de la citosina dentro de un dinucleótido 5'-CpG-3' y ocurre cuando un grupo metil de SAM es transferido enzimáticamente a la posición 5 de la citosina para generar 5-metilcitosina (5mC) (Kundu & Peterson, 2009). La adición del grupo metilo a la citosina en el ADN es catalizada por las metiltransferasas de ADN (DNMT). En vertebrados existen 3 tipos: la DNMT1, la DNMT3a y la DNMT3b. La DNMT1 es

la más abundante y su función está relacionada con el mantenimiento de las metilaciones ya que es capaz de metilar el ADN hemimetilado luego de la replicación (Avvakumov et al., 2008; Denis, Ndlovu, & Fuks, 2011). Las DNMT3a y b funcionan como metiltransferasas *de novo* (B.-F. Chen & Chan, 2014), para metilar completamente los sitios CpG no metilados y actúan principalmente durante el desarrollo primario de los mamíferos (Denis et al., 2011). De esta manera establecen los patrones de metilación de ADN, remodelamiento epigenético y reprogramación durante la diferenciación (B.-F. Chen & Chan, 2014; Smith & Meissner, 2013). La metilación de las islas CpG, especialmente aquellas localizadas con promotores y otras zonas regulatorias (Rose & Klose, 2014), previenen la unión estable de proteínas regulatorias como los factores de transcripción y por lo tanto reprimen la expresión génica.

Otro mecanismo de regulación epigenética es la metilación de ARN, el cual se da a nivel postranscripcional. La modificación del ARN puede darse en el ARN ribosomal, de transferencia, mensajero; los cuales pueden ser metilados mayoritariamente en la posición N6 de la adenosina (m6A) (Cooper, 2012; Yue, Liu, & He, 2015). La adición del grupo metilo esta mediada por el complejo multiproteico denominado METTL3-14 (P. Wang, Doxtader, & Nam, 2016; X. Wang et al., 2016) que actúa en conjunto con la proteína WATP (Liu et al., 2014). La metilación del ARN mensajero es la modificación más importante en las células somáticas (Batista et al., 2014) y se da en la región 5' UTR, en la región 3'UTR, en el sitio de inicio de traducción o en el sitio de término de traducción (Meyer et al., 2012). La metilación del ARN cumple diferentes roles en su metabolismo determinando su vida media (Parker & Sheth, 2007), su localización subcelular (X. Wang et al., 2014), su traducción en proteína (Lin, Choe, Du, Triboulet, & Gregory, 2016; Meyer et al., 2015); y en la maduración o *splicing* (Roundtree & He, 2016). Otra clase de ARN importante son los microARN, los cuales está constituidos por

ARNs pequeños no codificantes que regulan la expresión génica a nivel postranscripcional y tienen una gran importancia en la diferenciación celular, proliferación y apoptosis (Finnegan & Pasquinelli, 2013; Winter, Jung, Keller, Gregory, & Diederichs, 2009). Los microARN también están sujetos a metilación de la adenosina en la posición 6 y de manera similar como en el ARN mensajero es importante en su biogénesis. Esta marca epigenética se da en los pri-miRNA (Alarcon, Lee, Goodarzi, Halberg, & Tavazoie, 2015; Berulava, Rahmann, Rademacher, Klein-Hitpass, & Horsthemke, 2015; T. Chen et al., 2015) y es reconocida por el complejo HNRNPA2B1 que interactúa con DGCR8 y permite la conversión del pri-miARN en pre-miARN (Alarcon, Goodarzi, et al., 2015; Alarcon, Lee, et al., 2015), para posteriormente ser procesados en microARN maduros.



**Figura 6.-Esquema del metabolismo del Folato.** El folato ingresa a la célula a través del receptor FolR1 y del transportador RFC1 en forma de 5-metil tetrahydrofolato el cual es convertido a 5,10 metil tetrahydrofolato por la enzima MTHFR, posteriormente es transformada en metionina por las enzimas MS/MTRR y por MAT en S-adenosil metionina (SAM) para ser utilizada como donador de grupos metilo durante la metilación de ADN, ARN o histonas. Adicionalmente el 5-metil tetrahydrofolato es convertido en tetrahydrofolato el cual por medio de MTHFD se transformara en 5,10-metilen tetrahydrofolato, este compuesto es utilizado por TYMS para la síntesis de timina a partir de uracilo. MTHFR: metiltetrahydrofolato reductasa, MS: metionin sintasa, MTRR: metionin sintasa reductasa, MAT: metionin adenosil transferasa, SAHH: S-adenosil homocistein hidrolasa, MTHFD: metilen tetrahydrofolato dehidrogenasa, DHFR: dihidro folato reductasa, TYM: timilidato sintasa. *Adaptado de* Lee, M. S., J. R. Bonner, D. J. Bernard, E. L. Sanchez, E. T. Sause, R. R. Prentice, S. M. Burgess and L. C. Brody (2012). "Disruption of the folate pathway in zebrafish causes developmental defects." *BMC Dev Biol* 12: 12.

En este sentido podemos especular que la deficiencia de folato, y por lo tanto de SAM, puede afectar la expresión de microARNs que puedan cumplir una función importante en el normal desarrollo neural y de las células de la cresta neural, aunque hasta el momento existen muy pocos estudios que establecen esta asociación (Parchem et al., 2015).

### **2.3.2 Epigenética y desarrollo de las células de la cresta neural**

La metilación del ADN cumple un rol importante en la regulación de la expresión génica ya sea a través de un silenciamiento génico causado por una hipermetilación en la región promotora del gene o una activación génica a través de una hipometilación (Miranda & Jones, 2007). La regulación epigenética a nivel del ADN se da por medio de demetilación global y remetilación durante el proceso de diferenciación y desarrollo de los vertebrados para generar una metilación específica de tejido (Crider et al., 2012). Las alteraciones que se puedan presentar en los patrones de metilación del ADN durante el proceso de desarrollo pueden llegar a generar diferentes enfermedades. Entre estas enfermedades se encuentran desordenes de la impronta genómica como el síndrome de Angelman o Prader Willi y el síndrome del X-frágil, entre otros. Actualmente se sabe que la alteración en la metilación del genoma por hipermetilación (de genes supresores de tumores) e hipometilación (de proto-oncogenes) está relacionada con diferentes tipos de cáncer como el cáncer de colón, cáncer de ovario, cáncer gástrico, entre otros (Robertson, 2005; Smith & Meissner, 2013; Warren, 2007).

En los últimos años han surgido diversos trabajos que demuestran la importancia de las modificaciones epigenéticas en el desarrollo normal del tubo neural y de las células de la cresta neural (Bouzas et al., 2016; Hu et al., 2012; Hu, Strobl-

Mazzulla, Simoes-Costa, Sanchez-Vasquez, & Bronner, 2014; Strobl-Mazzulla & Bronner, 2012; Strobl-Mazzulla et al., 2010). Particularmente, estos trabajos han demostrado la importancia de las metilaciones del ADN e histonas en la especificación y migración de las células de la cresta neural y en la especificación del territorio neural en etapas tempranas del desarrollo. En este sentido, el folato, como cofactor necesario para la formación del donador universal de grupos metilos SAM, se encontraría posicionado como un componente limitante para el establecimiento de los patrones de metilación de ADN e histonas necesarios para la correcta expresión de genes y microARNs que regulen el normal desarrollo del tubo neural y de las células de la cresta neural.

### **3.- OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo general:**

- Determinar el efecto epigenético de la deficiencia de folato en el desarrollo del tubo neural y de las células cresta neural.

#### **3.2 Objetivos específicos:**

- Determinar el efecto de la pérdida de función del receptor FOLR1 y del transportador RFC1 en la metilación global del ADN y ARN.
- Determinar el efecto de la pérdida de función del receptor FOLR1 y del transportador RFC1 durante la especificación neural y de las células de la cresta neural.

### **4.- HIPÓTESIS DE LA INVESTIGACIÓN**

Los transportadores de folato FolR1 y RFC1 se expresan principalmente en los progenitores neurales y en las células de la cresta neural; y el SAM generado en los mismos es requerido para establecer el correcto patrón de metilación necesario para su especificación. La deficiencia de estos transportadores conlleva a una disminución de la metilación global del ADN y ARN y esto afectaría la expresión de genes claves para el desarrollo neural y de las células de la cresta neural.



## 5.- MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1 Material Biológico

Todos los experimentos se realizaron en el modelo aviar *Gallus gallus* (pollo), los huevos fertilizados de pollo se obtuvieron de fuentes comerciales locales y fueron incubados a 37.8°C hasta obtener los estadios deseados para los análisis de acuerdo a los criterio de Hamburger & Hamilton, 1951.

### 5.2 Materiales de laboratorio

#### 5.2.1 Reactivos

- Cloruro de Sodio NaCl-**Biopack**
- Cloruro de Magnesio  $\text{CaCl}_2$ -**Sigma-Aldrich**
- Cloruro de Potasio KCl-**Biopack**
- Fosfato de sodio dibasico heptahidratado  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ -**Biopack**
- Fosfato de potasio monobásico  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -**Anedra**
- Buffer para PCR 10x con  $\text{MgCl}_2$ -**Invitrogen**
- Isopropanol-**Biopack**
- Agua ultrapura Ultrapure Distilled Water DNase, RNase free-**Invitrogen**
- dNTPs (dATP, dTTP, dCTP, dGTP) -
- Taq polimerasa 5U/uL-**Invitrogen**
- Morfolinos de Splicing acoplados a Fluoresceina contra FoIR1 (FoIR1spMO 300nmoles) y RFC (RFCspMO 300nmoles)-**Gene Tools**.
- Plásmido pCIG-H<sub>2</sub>BRFP-IRES-
- Primer Forward FoIR1sp y RFCsp-**Invitrogen**
- Primer Reverse FoIR1sp y RFCsp-**Invitrogen**
- Loading Buffer 6X DNA loading Dye-**Fermentas**
- Marcador de peso molecular 1Kb Plus DNA Ladder 1ug/ul-**Invitrogen**
- Metanol Absoluto - **Anedra**

- Formamida-**Anedra**
- Ácido etilendiaminotetraacético EDTA-**Biopack**
- Formamida-**Anedra**
- Dietilpirocarbonato DEPC-**Sigma**
- 3-(3-colamidopropil)dimetilamonio)-1-proponasulfonato **CHAPS-Thermo Scientific**
- Tween20-**Biopack**
- Tritón 100X-**Biopack**
- Blocking Reagent-**Roche**
- Sales de sodio de heparina de mucosa intestinal de porcino-**Sigma**
- Ácido Maleico-**Sigma**
- Hidroxido de Sodio-**Biopack**
- Tris-**Biopack**
- Nitro azul de tetrazolio NBT-**Promega**
- 5-bromo-4-cloro-3-indol fosfato-**Promega**
- Citrato de Sodio-**Anedra**
- Ácido Borico -**Biopack**
- Anticuerpo anti-dioxigenina acoplado con fosfatasa alcalina fragmento Fab-**abcam**
- Kit RNAqueous Isolation Kit-**Ambion**
- Buffer 5x DNasa I, DNasa I grado amplificación-**Invitrogen**
- EDTA 25Mm-**Invitrogen**
- Random Primers-**Invitrogen**
- 5X First Strand Buffer-**Invitrogen**
- 0.1M DTT-**Invitrogen**
- RNase Out Recombinante, inhibidor de ribonucleasas (40U/ul)-**Invitrogen**
- SuperScript II RT (1U/ul)-**Invitrogen**

- Fenol:Cloroformo:Alcohol Isoamilico (25:24:1)-**Sigma**
- Etanol absoluto-**Biopack**
- Isopropanol-**Biopack**
- Proteinasa K en polvo-**Promega**
- Azul de metileno-**Sigma**
- Anticuerpo primario monoclonal de ratón anti-5 metilcitosina (5mC)-**abcam**
- Anticuerpo secundario goat anti mouse acoplado con fosfatasa alcalina -**abcam**
- Anticuerpo primario monoclonal de conejo anti-6 metil adenosina (6mA)-**abcam**
- Anticuerpo secundario acoplado con fosfatasa alcalina Goat anti rabbit-**abcam**
- Anticuerpo primario monoclonal de conejo anti FITC-**Invitrogen**
- Anticuerpo secundario Alexa Fluor Goat anti Rabbit 488-**Invitrogen**
- Brumuro de Etidio 10mg/ml-**Invitrogen**

#### 5.2.2 Equipos

- Tercmociclador Mastercycler Nexus gradient-**Eppendorf**
- Equipo para electroforesis horizontal-**BioRad**
- Fotodocumentador Foto/Analyst Investigator-**Fotodyne Incorporated**
- Estereoscopios NikonSMZ2800, NikonSMZ745-**Nykon**
- Microscopio óptico y de fluorescencia Nikon eclipse E600-**Nykon**
- UV Crosslinker Hoefer UVC500 Crosslinker-**Amershan Biosciences**
- Centrifuga refrigerada eppendorf 518R-**Eppendorf**
- Criostato
- Heladera 4°C-**Gafa**
- Nevera -20°C-**Peabody, KOH-I-NOOR**
- Nevera -80°C-**Thermo Scientific**
- Incubadora-**A.ADAMI FABRICA**
- Incubadora Temperature Incubator DH500BII-**Milab**
- Electroporador Electroporator power supply-**Bioelectronics Shop**

- Máquina de hielo-**Brema Ice Maker**
- Generador de agujas de inyección y microinyección Model PC-10-**Narishige**
- Potenciometro pH/ORP meter-**HANNA Instruments**
- Mezclador Heating Magnetic Stirrer-**VELP científica**
- Placas Petri de 35 mm x 10 mm - **Corning**
- Capilares 0.8 x 100mm-**Kimble Chase**
- Micropipetas de 2 ul y 20 ul **Eppendorf**; 10 ul, 100 ul y 1 ml **Thermo Scientific**
- Tubos de 0.2 ml, 0.5 ml, 1.5 ml, 2 ml
- Pipetas Pasteur 1.5ml – **Kartell S.p.a.**
- Pestles autoclavados
- Membrana de Nylon Cargada positivamente Hybond-N+ - **GE Healthcare**
- Pinza de punta fina
- Portaobjetos 25.4x76.2mm-**Glass Klass**; cubreobjetos 24x36mm-**Biotraza**
- Copling de 50ml
- Membrana de nitrato de celulosa de 0.22um de poro- **Sortorius Stedin**

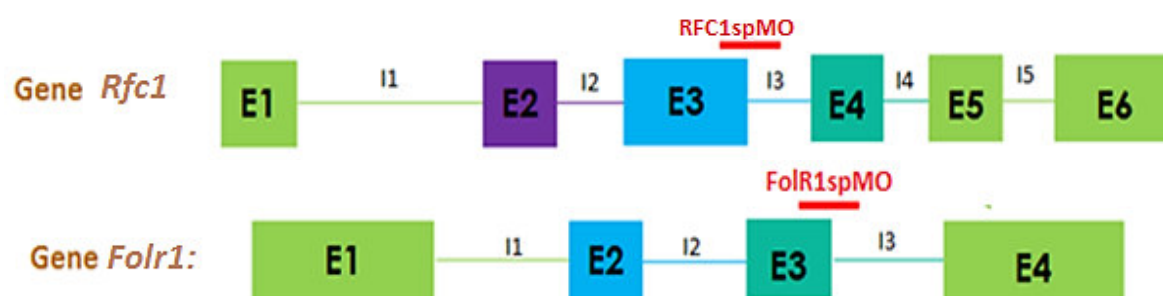
### 5.3 Métodos

#### 5.3.1.- Morfolinos de splicing

La reducción de la expresión de los transportadores de folato se realizó mediante el uso de morfolinos de *splicing*, los cuales fueron obtenidos de la empresa GeneTools. Estos morfolinos son oligonucleótidos de 25 pares de bases (**TABLA N°1**) complementarios a una región del pre-ARN mensajero (**Fig. 7**) y que están acoplados a Isotiociano de Fluoresceina (FITC) para su observación mediante microscopía de fluorescencia.

**TABLA N°1**

Morfolino	Secuencia	ARNm diana	Región complementaria
<b>RFC1spMO</b>	5'-ATGTCCCACCCACATACCTAGCAGC-3'	pre-ARNm <i>Rfc1</i>	Exón3-Intrón3
<b>FolR1spMo</b>	5'-GCAGAGCCCACTGACCTGTTGCCCA-3'	pre-ARNm <i>Folr1</i>	Exón3-Intrón3



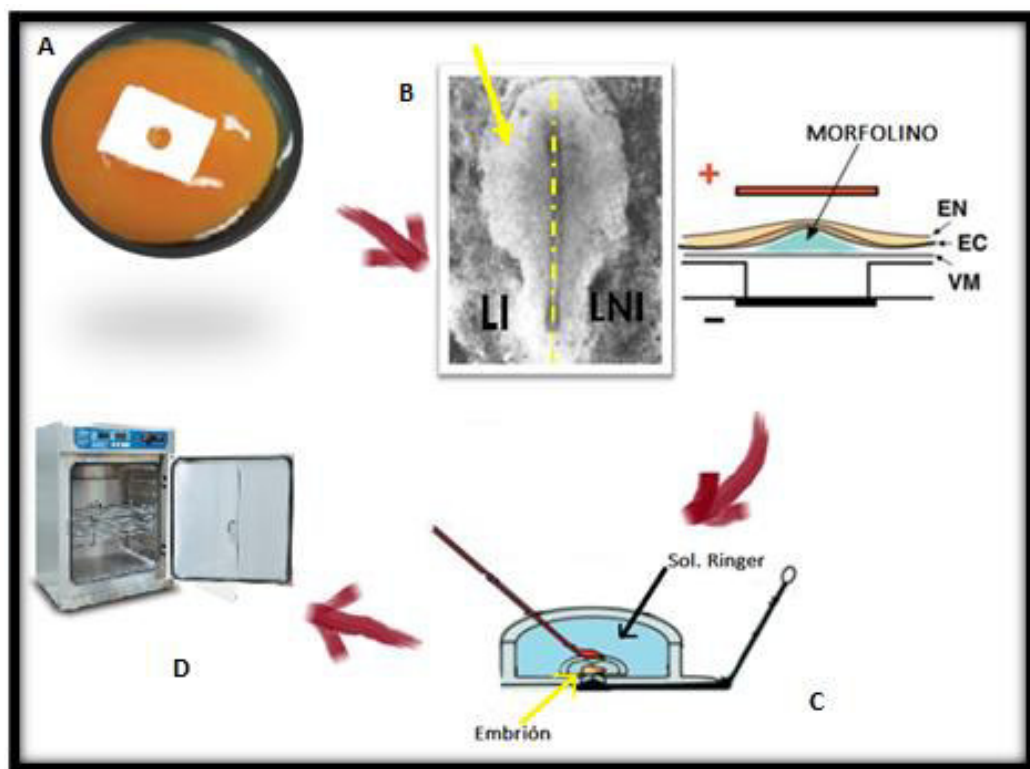
**Figura 7.-Esquema de la región complementaria de los morfolfos.** La secuencia de los morfolfos es complementaria a una región de 25 pares de bases que comprende el Exón 3 y el Intrón 3 tanto de los genes *Rfc1* y *Folr1*.

### 5.3.2- Electroporación

La técnica de electroporación utilizada para transferir los morfolfos en estadios tempranos del desarrollo de embriones de pollo fue estandarizada en el laboratorio tomando en cuenta protocolos ya descritos con anterioridad (Hatakeyama & Shimamura, 2008; Voiculescu, Papanayotou, & Stern, 2008) (**Fig. 8**). Los huevos de pollo fertilizados fueron incubados hasta el estadio 4HH (**Fig. 8A**) y posteriormente se realizó la extracción de dichos embriones utilizando papel filtro con un orificio en el medio. Los embriones extraídos fueron lavados y mantenidos en solución Ringer's durante todo el procedimiento. El morfolino fue inyectado en el lado izquierdo del embrión (**Fig. 8B**), el cual se consideró lado inyectado (LI), mientras que el lado derecho, lado no inyectado (LNI), fue el lado control. Una vez realizado la inyección se utilizó el diferencial de potencial de 6.5mV del electroporador para realizar la transferencia del morfolino a las células del embrión. Los embriones electroporados

fueron puestos en placas de 35 mm que contenían albumina y las cuales fueron selladas e incubadas a 37.8°C hasta el estadio deseado para el análisis. Los embriones correctamente electroporados presentaban el lado izquierdo fluorescente al ser vistos en una lupa de fluorescencia. **(Fig. 9).**

La eficacia del morfolino se evaluó mediante PCR de los ADNc de *Folr1* y *Rfc1*. Para ello se utilizó embriones en el St.9 (HH) y se corroboró la inyección en el lado izquierdo mediante microscopia de fluorescencia, se les retiró de la placa de 35 mm y se les mantuvo en solución Ringer's. Posteriormente fueron cortados a lo largo del eje antero-posterior y se separó el lado inyectado (izquierdo) del lado no inyectado (derecho) **(Fig. 9)**. Finalmente, se realizó la extracción de ARN total de ambos cortes en tubos separados.



**Figura 8.-Esquema del proceso de electroporación.** A.- Los embriones fertilizados después de ser incubados son extraídos del huevo usando un papel filtro, posteriormente son mantenidos y lavados en solución Ringers. B.- El morfolino es inyectado en el lado izquierdo del embrión (lado inyectado-LI) entre la membrana vitelina y el ectodermo. C.- la electroporación se realiza mediante un electroporador y dos electrodos. D.- Los embriones electroporados son incubados a 37.8°C hasta el estadio deseado. Adaptado de Hatakeyama, J. and K. Shimamura (2008). "Method for electroporation for the early chick embryo." *Dev Growth Differ* **50**(6): 449-452.



**Figura 9.-Selección de embriones St.9 (HH).** Izq.- Embrion de estadio 9 (HH). Der.- Embrión observado en una lupa de fluorescencia.

### 5.3.3 Eficacia del morfolino

La extracción de ARN total se realizó usando el kit RNAqueous (Ambrión) siguiendo el protocolo de la empresa. Posteriormente el ARN total extraído fue cuantificado y se evaluó su pureza mediante el índice 260/280 en un espectrofotómetro SynergyH1 (BioTek). El ARN extraído fue convertido en ADNc utilizando un termociclador (Applied Biosystems) empleando el siguiente protocolo: 1 µg de ARN extraído fueron mezclados con 1 µL de oligonucleótidos aleatorios (random primers), 1 µL de mix de dNTP, calentados a 65°C por 5 min e inmediatamente después se sumergió en hielo. Posteriormente se añadió 4 µL de buffer 5x First-Strand (Invitrogen), 2 µL de 0.1M DTT (Invitrogen), 1 µL RNase OUT (40 U/µL), se mezcló y se incubó a 25°C por 2 min. Pasado los 2 min se adicionó 0.5 µL de SuperScript RT (1U/µL, Invitrogen) se mezcló y se incubó a 25 °C por 10 min. Finalmente se inactivó la reacción por calor a 70 °C por 15 min. La extracción de ARN se realizó para los embriones inyectados con el morfolino FolR1spMO y RFC1spMO.

### 5.3.3.1 PCR del ADNc del transportador *RFC1*

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se realizó utilizando los oligonucleótidos específicos F\_Rfc1sp y R\_Rfc1sp (**TABLA N°2**) que flanqueaban el sitio de unión del morfolino (**Fig. 10**). El producto generado por estos oligonucleótidos presenta tres posibles amplicones: uno de 1239 pb que mantiene el intrón 3 (**Fig. 10A**), el segundo de 302 pb que elimina el exón 3 (**Fig. 10B**) y el tercero de 1077 pb que es el amplicón no afectado por el morfolino. La PCR se realizó bajo el siguiente protocolo:

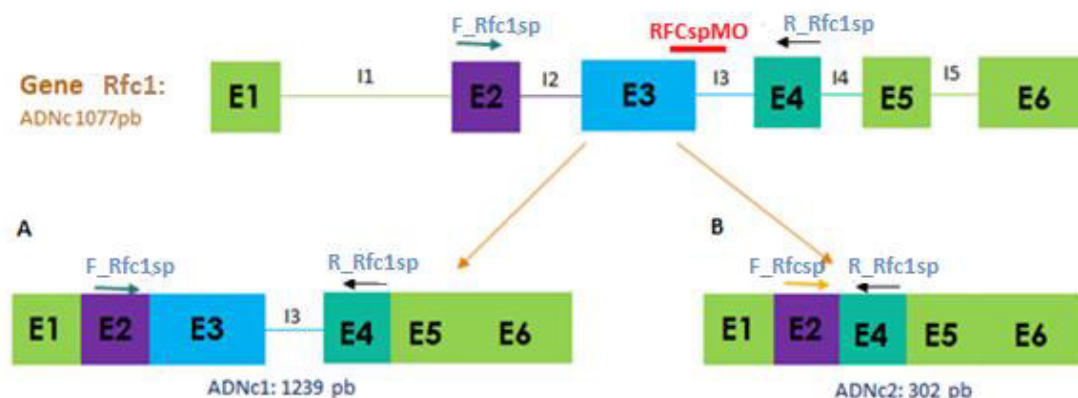
**TABLA N°2**

Oligonucleótido	Secuencia
F_Rfc1sp	5'-TGCAGGTCTTCTACCTGTGC-3'
R_Rfc1sp	5'-TAGCGATGGGAACCAGAAAC-3'

	1x
Agua UP	10.7µL
Oligonucleótido Forward (10uM)	0.5µL
Oligonucleótido Reverse (10uM)	0.5 µL
10x Buffer Taq Polymerasa (Roche)	1.5 µL
Taq DNA Polymerasa (Roche)	0.3 µL
dNTPs (Roche)	0.5 µL
ADNc	1 µL
Volumen final	15 µL

Protocolo de PCR		
35 ciclos	95°C	5 minutos
	95°C	30 segundos
	54°C	40 segundos
	72°C	1 minuto
	72°C	5 minutos





**Figura 10.-Esquema de los amplicones de *Rfc1* a ser obtenidos.** El gen *Rfc1* consta de 6 exones y 5 intrones, el morfolino RFC1spMO se complementa con la región E3/I3 generando una alteración del proceso de maduración del pre-ARNm. El amplificado con los oligonucleótidos señalados podría generar dos amplicones: A.- de 1239pb que se genera cuando el pre-ARNm mantiene el intrón 3 en su secuencia durante el procesamiento y B.- de 302pb que se genera cuando el pre-ARNm ha perdido el exón 3 durante el procesamiento.

#### 5.3.3.2 PCR del ADNc del receptor *Folr1*

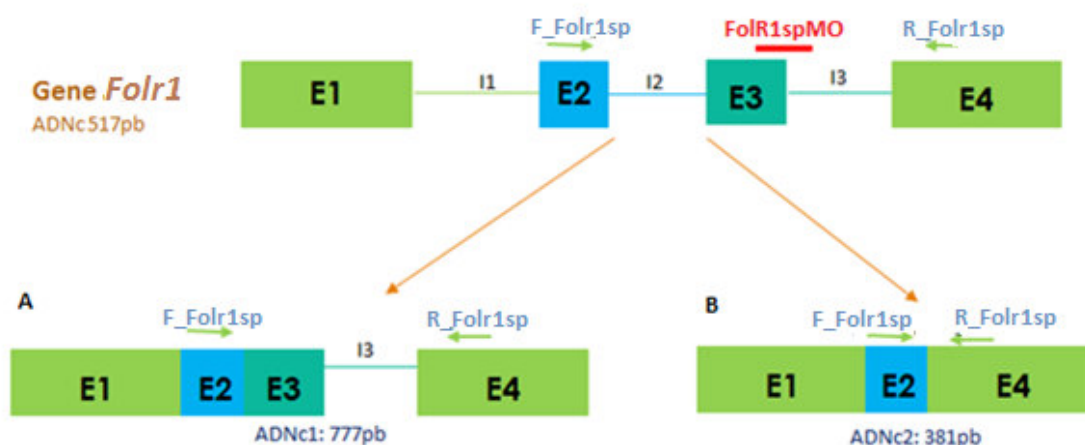
La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se realizó utilizando oligonucleótidos específicos para el gen RFC (**TABLA N°3**) y que flanqueaban el sitio de unión del morfolino. (**Fig. 11**). El producto generado por estos oligonucleótidos presenta tres posibles amplicones: uno de 777 pb que mantiene el intrón 3 (**Fig. 11A**), el segundo de 381 pb que elimina el exón 3 (**Fig. 11B**) y el tercero de 517pb que es el amplicón no afectado por el morfolino. La PCR se realizó bajo el siguiente protocolo:

**TABLA N°3**

Oligonucleótido	Secuencia
F_Folr1sp	5'-CTGGAAGGACAATGCCTGCT-3'
R_Folr1sp	5'-CCAGGCGTAGTACTTTGCCA-3'

1x	
Agua UP	10.7 µL
Oligonucleótido Forward (10uM)	0.5 µL
Oligonucleótido Reverse (10uM)	0.5 µL
10x Buffer Taq Polymerase (Roche)	1.5 µL
Taq DNA Polymerase (Roche)	0.3 µL
dNTPs (Roche)	0.5 µL
ADNc	1 µL
Volumen final	15 µL

Protocolo de PCR		
35 ciclos	95°C	5 minutos
	94°C	40 segundos
	65°C	40 segundos
	72°C	90 segundos
	72°C	5 minutos



**Figura 11.-Esquema de los amplicones de Folr1 a ser obtenidos.** El gen RFC consta de 4 exones y 3 intrones, el morfolino RFCspMO se complementa con la región E3/I3 generando una alteración del proceso de maduración del pre-ARNm. Las dos variantes anormales del procesamiento son: A de 777pb que se genera cuando el pre-ARNm mantiene el intrón 3 en su secuencia durante el procesamiento y B de 381pb que se genera cuando el pre-ARNm ha perdido el exón 3 durante el procesamiento.

Las amplificaciones de las PCR fueron corridas en una cámara de electroforesis horizontal en un gel de agarosa de 1% mezclado con bromuro de etidio a 90 mV durante 1 hora. Se usó *buffer* de carga 6X que contenía orange G para sembrar en los pocillos del gel de agarosa y se utilizó como marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA ladder (Invitrogen). Se reveló usando un transluminador UV Fotodyne gel imager el cual posee una cámara acoplada para tomar las fotografías correspondientes.

#### 5.3.4.- Metilación global del ADN Y ARN

##### 5.3.4.1.- Metilación de ADN

La variación de metilación del ADN se evaluó mediante el ensayo de Dot Blot contra el nucleótido 5-metil citosina, para lo cual en primer lugar se realizó la extracción de ADN genómico procedente del tubo neural de la región cefálica., posteriormente fueron cortados a lo largo del eje antero-posterior y se separó el lado inyectado del lado no inyectado (**Fig. 9**).

La extracción de ADN genómico se realizó utilizando el método de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico. Este incluye la lisis del tejido en 600 uL de buffer de lisis (100 mM Tris-HCl pH 8.5, 5 mM EDTA, 200 mM NaCl y 0.2% SDS) al que se le añadió proteinasa K *overnight* a 55°C. La muestra fue tratada con RNasa A a 37 °C durante 15 minutos, posteriormente se añadió un volumen igual de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1), se mezcló por inversión manual y se centrifugó a 12000 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente para separar el ADN del resto de material celular. Cuidadosamente se transfirió la fase superior acuosa que contiene el ADN a un tubo fresco y se añadió un volumen igual de isopropanol, se mezcló la solución por inversión manual y luego se centrifugó a 12000 rpm por 2 minutos a 4 °C. El precipitado obtenido se lavó con

1 mL de etanol 75% y centrifugó a 12000 rpm por 2 minutos a 4°C. El etanol fue removido y se secó a temperatura ambiente por 5 min para finalmente re-suspender el ADN en agua ultra pura a 55°C por 1 hora. La extracción de ADN se realizó para los embriones inyectados con morfolino ForlR1spMo y RFC1spMO

#### 5.3.4.1.1.- Dot Blot de ADN contra 5mC

El ensayo de Dot Blot se realizó utilizando el protocolo puesto a punto en el laboratorio. Se pipeteo 2 µL de ADN extraído de los tratamientos (ForlR1spMO y RFC1spMO) en las concentraciones de 0 ng (control), 20 ng, 40 ng y 80 ng en membranas de nylon cargadas positivamente (Hybond+). Se dejó secar la membrana por 30 min y se procedió a inmovilizar las muestras mediante radiación ultravioleta utilizando un *crosslinker* (Amershan). Posteriormente se tiñó la membrana con azul de metilo 0.04% por 30 minutos, se procedió a lavar dos veces con agua destilada para eliminar el exceso de azul de metileno de la membrana y se tomó una fotografía para el análisis de control de carga. La membrana fue bloqueada con TBSw (tween 20, 0.1%) + 5% leche pH 7.6 y se incubo *overnight* a 4°C en rotación con el anticuerpo primario Mouse anti-5mC (abcam) 1:500 en TBSw+5% leche pH7.6; posteriormente se realizaron 4 lavados de 30 minutos cada uno con TBSw 0.1% pH 7.6 y se incubó con el anticuerpo secundario acoplado a fosfatasa alcalina Goat anti-Mouse IgG1 (abcam) 1:10000 en TBSw+5% leche durante 3 horas en rotación y se lavó 3 veces durante 30 minutos con TBSw pH 7.6. Se reveló usando 4.5 µL de NBT y 3.5 µL de BCIP (Promega) en 1 mL de buffer fosfatasa durante 1 hora en agitación y se tomó una segunda fotografía para el análisis de intensidad de metilación del ADN.

#### 5.3.4.1.2.- Análisis de la cantidad de ADN metilado

El análisis de la cantidad de ADN metilado se realizó mediante el software ImageJ. Se utilizó la primera fotografía de la membrana teñida con Azul de metileno 0.04% para el control de carga y la segunda fotografía revelada con NBT/BCIP para determinar la cantidad de 5mC presente en el ADN.

Las fotografías fueron abiertas en el programa ImageJ en formato .jpg y se ajustó el tipo de imagen a RGB Stack. Posteriormente se editó la imagen obteniendo una imagen invertida, se sustrajo el ruido de fondo y se generó la imagen a ser utilizada para el análisis del programa (**Ver ANEXO 10.2.1**). Se definió el área para los análisis como el mayor círculo de todos y se mantuvo esa área invariable durante toda la medición de intensidad. Finalmente, se realizó la medida de intensidad de cada spot y se obtuvo los valores de RawIntDen proporcionados por el software tanto para el lado no inyectado LNI (control) como para el lado inyectado LI (tratamientos), se restó el valor determinado para el LNI de los valores obtenidos para el LI (FolR1spMO y RFC1spMO); estos valores finales fueron utilizados para la cuantificación de la abundancia relativa de 5mC en el ADN. Este procedimiento se realizó para la fotografía de tinción con azul de metileno 0.04% y el revelado con NBT/BCIP.

La abundancia relativa (A.R.) se determinó mediante un cociente de los valores RawIntDen finales (**Ver ANEXO 10.2.1**) del revelado con NBT/BCIP y los valores de la tinción con azul de metileno 0.04% como se observa en la ecuación 1.

$$A.R = \frac{NBT/BCIP}{azulmet.} \dots\dots\dots \text{Ecuación 1}$$

Donde:

NBT/BCIP representa los valores finales de RawIntDen para el revelado de NBT/BCIP contra m6A o 5mC

azulmet representa los valores finales de RawIntDen para la tinción con azul de metileno para ADN o ARN

Con esos valores se realizó un gráfico de barras para una mejor visualización de la variación. (**Ver ANEXO 10.2.1**). Adicionalmente se determinó el porcentaje de reducción respecto al control mediante el cociente, como se observa en la ecuación 2

$$\%R = \frac{A.R.tratado}{A.R.control} \times 100\%. \dots\dots\dots \text{Ecuación 2}$$

#### 5.3.5.- Metilación de ARN

La variación en la metilación del ARN se evaluó mediante el ensayo de Dot Blot contra el nucleótido 6-metil Adenina (6mA) para lo cual se utilizó ARN total extraído mediante el kit RNAqueous (Ambion) siguiendo el protocolo del fabricante. Esta extracción se realizó del mismo modo que para la del ADN donde el lado derecho y lado izquierdo del embrión fueron procesados de manera separada. (**Fig. 9**)

##### 5.3.5.1.- Dot Blot de ARN contra m6A

El ensayo de Dot Blot se realizó utilizando el protocolo modificado de Yuan et al., 2014; G. Zhang et al., 2015. Se pipeteó 2 µL de ARN extraído de los tratamientos (ForIR1spMO y RFC1spMO) en las concentraciones de 0 ng (control), 15 ng, 30 ng y 60 ng en membranas de Nylon cargadas positivamente (Hybond+). Se dejó secar la membrana por 30 min y se procedió a inmovilizar las muestras mediante radiación ultravioleta utilizando un crosslinker (Amershan). Posteriormente se tiñó la membrana con azul de metilo 0.04%-DEPC por 30 minutos, se procedió a lavar dos veces con agua destilada para eliminar el exceso de azul de metileno de la membrana y se

tomó una primera fotografía para el análisis de control de carga. La membrana fue bloqueada con TBSw-DEPC+5% leche pH7.6 y se incubó overnight a 4°C en rotación con el anticuerpo primario Rabbit anti-m6A (abcam) 1:500 en TBSw-DEPC+5% leche pH 7.6; posteriormente se realizaron 4 lavados de 30 minutos cada uno con TBSw 0.1% pH 7.6 y se incubó con el anticuerpo secundario acoplado a fosfatasa alcalina Goat anti Rabbit (abcam) 1:10000 en TBSw-DEPC+5% leche durante 1 hora en rotación y se lavó 3 veces durante 30 minutos con TBSw-DEPC. Se reveló usando 4.5 µL de NBT y 3.5 µL de BCIP (Promega) en 1 mL de buffer fosfatasa durante 1 hora en agitación y se tomó una segunda fotografía para el análisis de la intensidad de metilación del ARN.

#### 5.3.5.2.- Análisis de la cantidad de ARN metilado

El análisis de la cantidad de ARN metilado se realizó de manera similar al análisis del ADN mediante el software ImageJ. La primera fotografía de la membrana teñida con Azul de metileno 0.04% para el control de carga y la segunda fotografía de la membrana revelada con NBT/BCIP para determinar la cantidad de m6A presente. Se siguió los pasos descritos en la sección 5.5.1.2. **(Ver ANEXO 10.2.2 para la imagen generada para análisis y los datos de RawIntDen)**. De igual modo que para el ADN se determinó la abundancia relativa y el porcentaje de reducción **(Ver sección 5.5.1.2)**

#### 5.3.6.- Patrón de expresión del marcador de células de la Cresta Neural Sox10 y el marcador neural Sox2

Para evaluar el efecto en el desarrollo de la cresta neural los embriones inyectados con los morfolinis fluorescentes contra los pre-ARNm de *Folr1* (FolR1-spMO) y *Rfc1* (RFC1-spMO) fueron colectados en el estadio st9 (HH) y observados al microscopio

de fluorescencia para corroborar que estaban tratados y posteriormente ser utilizados en la hibridación *in situ*.

#### 5.3.6.1.- Hibridación *in situ* (HIS)

La HIS realizada consistió en un proceso de fijación-deshidratación, pretratamiento - hibridación, lavados pos hibridación, incubación con anticuerpo anti-digoxigenina conjugado a fosfatasa alcalina (AP) – lavados post-anticuerpo, revelados con NBT/BCIP-deshidratación y rehidratación - fotografía.

**Fijación - Deshidratación.** - Los embriones seleccionados fueron colocados en tubos eppendorf de 1.5 mL, fijados con 1.5 mL de paraformaldehído 4% overnight a 4°C. Luego lavados en PBSw-DEPC tres veces por 10 minutos cada lavado y posteriormente deshidratados en concentraciones crecientes de MeOH+PBSw-DEPC (25%, 50%, 75%) donde cada deshidratación se realizó por 10 minutos. Finalmente se agregó MeOH 100% por 15 minutos en agitación dos veces y se guardó en MeOH 100% a -20°C. Todos los pasos se realizaron en agitación y a temperatura ambiente.

**Pretratamiento - hibridación in situ.**- Los embriones guardados en 1.5ml de MeOH 100% a -20°C fueron rehidratados usando soluciones decrecientes de MeOH+PBSw por 10 min cada rehidratación y en agitación. Después se lavó con PBSw-DEPC dos veces por 5 minutos y una vez más durante 10 minutos (todo en agitación). Los embriones fueron tratados con proteinasa K (10ug/mL en PBSw-DEPC) durante 9 minutos a temperatura ambiente sin agitación. Se inactivó la proteinasa K con 2mg/mL de glicina en PBSw-DEPC durante 10 minutos a temperatura ambiente sin agitación. Luego se realizó una fijación con 4% paraformaldehído + 0.2% glutaraldehído por 20 minutos a temperatura ambiente en agitación, esta solución fue reemplazada después con el mix de hibridación (Formamida 50%, 1.3X SSC-DEPC pH5 con ácido cítrico, 5mM



EDTA pH 8.0, 200ug/ml tRNA, 0.2%Tween-20, 0.1% CHAPS-DEPC, 100ug/mL sal de heparina de sodio) por 5 minutos a temperatura ambiente. Se cambió la solución de mix de hibridación por una nueva solución precalentada a 70°C y se pre-hibridó a 70°C por 3 horas. Pasadas las 3 horas se agregó la solución precalentada de mix de hibridación conteniendo la sonda de RNA marcada con digoxigenina para Sox10 o Sox2) y se incubó a 70°C durante al menos 20 horas.

**Lavados post-hibridación.** - Después de las 20 horas se removi6 la solución de mix de hibridación + sonda de ARN y se guardó para posteriores usos. Los embriones fueron lavados dos veces con una solución de lavado (Formamida 50%, 1.3X SSC-DEPC pH5 con ácido cítrico, 5mM EDTA pH 8.0, 0.2% Tween-20, 0.1% CHAPS-DEPC) pre-calentada a 70°C durante 15 min cada lavado. El lavado se realizó 4 veces más a 70°C por 30 minutos, y posteriormente se agregó el mismo volumen de MABT (1xMAB pH7.5, 100 mM ácido maleico, 150 mM NaCl, 200 mM NaOH+0.1%Tween-20) y se dejó a 70°C por 30 minutos. Se continuó los lavados con MABT por 4 veces durante 30minutos cada lavado a temperatura ambiente y en agitación. Posteriormente se cambi6 por una solución de bloqueo (10% Boehringer blocking reagent en 1X MABT) por 3 horas a temperatura ambiente y en rotación. Después de las 3 horas se cambi6 la solución de bloqueo por una conteniendo el anticuerpo anti-dioxigenina (1:2000, ROCHE) acoplado a fosfatasa alcalina y se dejó overnight a 4°C y en agitación. Finalmente, se realizaron lavados con MABT por 5 minutos cada lavado, se continuó lavando 2 veces con MABT por 30 minutos cada lavado, luego reemplazando la solución cada 1 hora y un lavado overnight a 4°C.

**Revelado con NBT/BCIP – deshidratación.** - Se realizó un lavado con 100 mM Tris-HCl pH 9.5 por 30 min y luego con NTMT (100 mM NaCl, 100 mM Tris-HCl pH 9.5, 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1% Tween-20) recién preparada por 30 minutos en agitación y a temperatura ambiente. Se reveló agregando NBT/BCIP (1 mL

NTMT + 4.5  $\mu$ L NBT+3.5  $\mu$ L BCIP) se guardó en un lugar oscuro hasta obtener la coloración esperada. Posteriormente se detuvo la reacción lavando dos veces con 100 mM Tris-HCl pH 9.5 a temperatura ambiente. Se continuó lavando tres veces con PBSw durante 5 minutos cada lavado a temperatura ambiente, se fijaron nuevamente los embriones con 4% de paraformaldehído overnight a 4°C. Posteriormente realizaron 3 lavados con PBSw por 10 minutos cada lavado a temperatura ambiente para finalmente deshidratar los embriones con soluciones crecientes de MeOH+PBSw (25%, 50%, 75%) y dos lavados finales con 100% MeOH por 5 minutos. Los embriones fueron guardados a -20°C hasta el día siguiente. Todos los pasos se realizaron en agitación y protegidos de la luz con papel aluminio.

**Rehidratación-Fotografía.** - Los embriones fueron rehidratados con soluciones decrecientes de MeOH+PBSw (75%, 50%, 25%) durante 5 minutos cada lavado, tres lavados finales con PBSw por 5 minutos cada lavado. Para tomar las fotografías correspondientes los embriones fueron colocados en una placa excavada y observados al estereoscopio, el cual estaba acoplado con una cámara Nikon y conectado a una computadora.

#### 5.3.7.- Inmunofluorescencia de cortes de HIS

Para el análisis del efecto de la deficiencia de los transportadores de folato en el desarrollo neural, se realizó cortes transversales los embriones procesados con HIS para el marcador neural Sox2.

Los embriones seleccionados fueron rehidratados y lavados con PBSw como se describió en la sección 5.6.1 (rehidratación y fotografía) y transferidos a nuevos tubos eppendorf de 1.5 mL donde se les agrego 800  $\mu$ L de PBS + sucrosa 5 % y se dejó overnight a 4 °C, después se cambió con 800  $\mu$ L de PBS + sucrosa 15% overnight, al día siguiente se cambió la solución con PBSw + gelatina 7.5%

+ sucrosa 15% y se dejó por 4 horas a 37°C. Después de ser embebidos durante las cuatro horas fueron colocados en moldes de goma para ser luego congelados con nitrógeno líquido y mantenidos a -80 °C hasta el momento de realizar los cortes histológicos en un criostato. Para poder realizar los cortes se pasó los embriones de -80°C a -20°C 1 hora antes de realizar el corte y se procedió a entregar el material biológico al Servicio de Histología del IIB-INTECH donde se realizaron los cortes de 18 µm en un criostato a -30°C en portaobjetos pre-tratados con 3-Aminopropil-trietoxisilano (T.E.S.P.A.).

Las láminas con los cortes transversales fueron sometidas a inmunofluorescencia contra FITC (Isotiocianato de Fluoresceína) para determinar el lado inyectado con morfolino: las láminas fueron colocadas en un recipiente protegido de la luz que contenía PBS-T (PBS+0.1%triton100) se incubó a 42°C por 10 minutos para eliminar la gelatina de las láminas. Posteriormente se lavaron las láminas 2 veces con PBS-T por 10 minutos cada lavado a temperatura ambiente, se bloqueó con PBS-T+0.5%SFB por 45 minutos a temperatura ambiente. Después del bloqueo se agregó 120 µL del anticuerpo primario rabbit anti-FITC 1:100 diluido en PBSt+5%SFB a las láminas e inmediatamente fueron cubiertas con parafilm para asegurar una difusión adecuada del anticuerpo primario, las láminas se colocaron en una cámara húmeda y se dejó overnight a 4°C. Al día siguiente se lavó las láminas tres veces con PBS-T por 15 minutos cada lavado a temperatura ambiente, se agregó 120 µL del anticuerpo secundario goat anti-rabbit Alexa Fluor 488 (1:1000) e inmediatamente se cubrió con parafilm y se dejó en una cámara húmeda por 45 minutos a temperatura ambiente. Pasado los 45 minutos se realizaron 3 lavados con PBS-T por 10 minutos cada lavado a temperatura ambiente y se procedió a montar las láminas utilizando 100 µL de Fluoromount. Las láminas montadas

fueron observadas en un microscopio de fluorescencia que tiene acoplado una cámara y una computadora para el registro de las fotografías.

## 6.- RESULTADOS

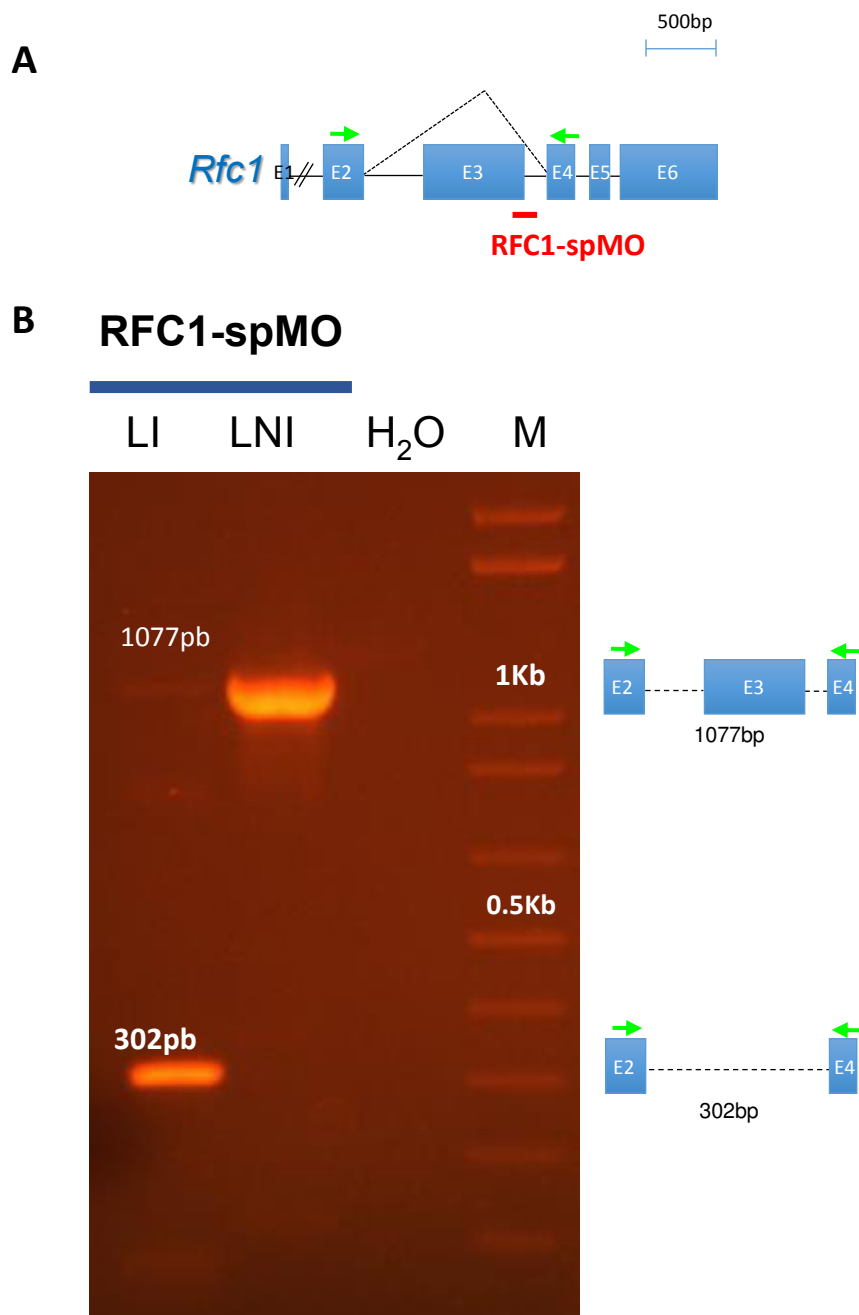
### 6.1.- Eficacia del morfolino

#### 6.1.1.- Determinación de la eficiencia del morfolino RFC1spMO

Con el fin de analizar si el morfolino RFC1spMO era capaz de afectar el *splicing* del ARN mensajero codificante de *Rfc1*, se realizó un experimento de RT-PCR en embriones tratados con dicho morfolino (**Fig. 12**). Los resultados muestran que en lado control no inyectado con el morfolino se obtuvo una amplificación de 1077 pb correspondiente al tamaño normal esperado (ver esquema en Fig. 9). Sin embargo, en la muestra correspondiente al lado inyectado (LI) con el morfolino se observa que la banda de 1077 pb es levemente detectable, mientras que se observa una banda fuerte de 302 pb correspondiente a la pérdida del exón 3. Esta pérdida del exón 3 además genera un corrimiento en el marco de lectura y la presencia de codones stop prematuros que nos permitirán determinar el efecto de la pérdida de función de RFC1.

#### 6.1.2.- Determinación de la eficiencia del morfolino FolR1spMO

El análisis mediante RT-PCR la eficiencia del morfolino de *splicing* FolR1spMO (**Fig. 13**) muestran que en el LNI se amplificó la banda de 517 pb correspondiente al tamaño del ARN mensajero maduro de FolR1 (ver esquema en Fig. 10). Mientras que en el LI se amplificó de manera más tenue la banda correspondiente a los 517 pb y además se observa 2 bandas adicionales que no corresponden con los tamaños predichos de los posibles *splicings* alternativos y pueden ser consecuencia del uso de sitios donores y aceptores de *splicing* crípticos.

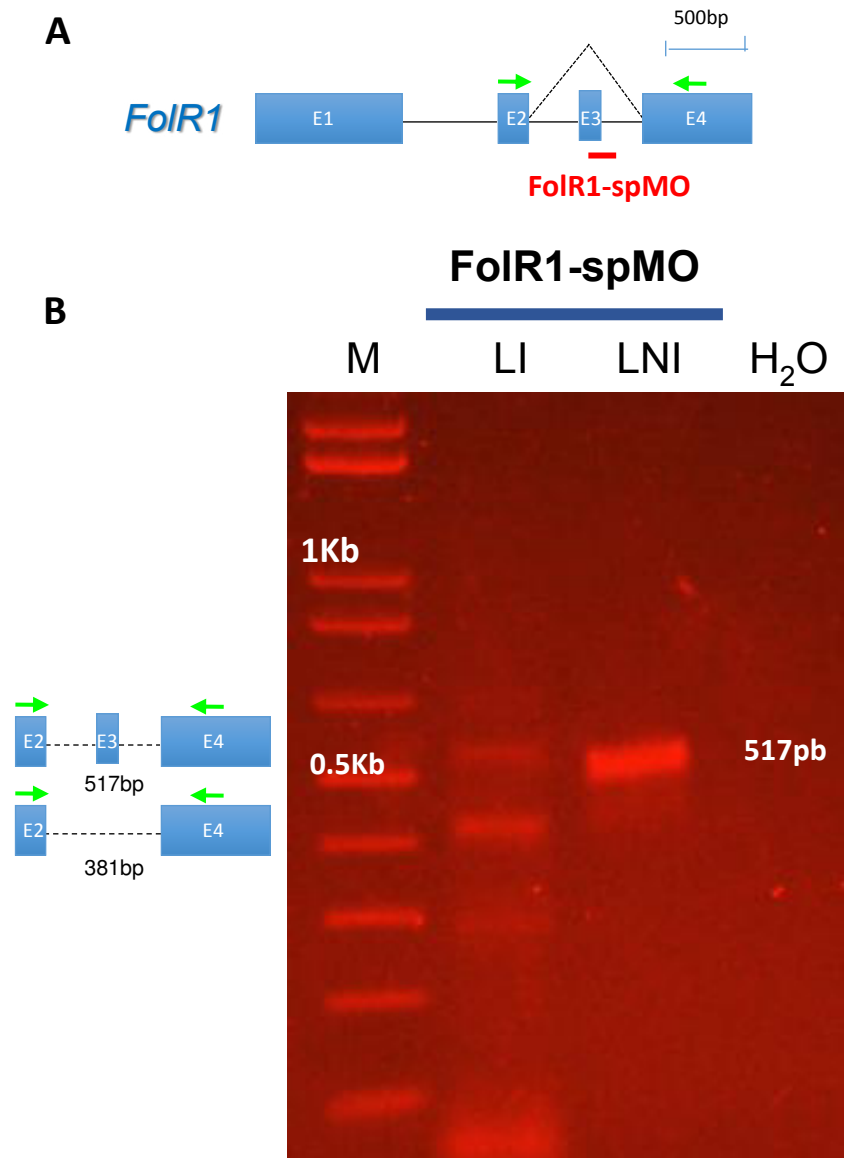


**Figura 12.-Determinación de la eficiencia del morfolino RFC1spMO.**

**A.** Esquema del cuerpo del gen *Rfc1*. **B.** Electroforesis horizontal de los amplicones obtenidos por PCR. El lado no inyectado (LNI) presenta una intensa banda de 1077pb correspondiente al ARNm maduro; mientras que en el lado inyectado (LI) esta banda está drásticamente disminuida y aparece una banda de 302pb. H<sub>2</sub>O: control negativo, M: marcador de peso molecular 1Kb plus DNA ladder.

**Figura 13.-Electroforesis del receptor de folato *Folr1*.**

**A.** Esquema del cuerpo del gen *Folr1*. **B.** Electroforesis horizontal de los amplicones obtenidos por PCR. El lado no inyectado (LNI) presenta una banda de 527pb correspondiente al ARm maduro; mientras que en el lado inyectado (LI) esta banda se encuentra reducida y aparecen dos bandas adicionales de aproximadamente 280pb y 381pb. H<sub>2</sub>O- control negativo, M: marcador de peso molecular 1Kb plus DNA ladder.



## 6.2.- Metilación global de ADN y ARN

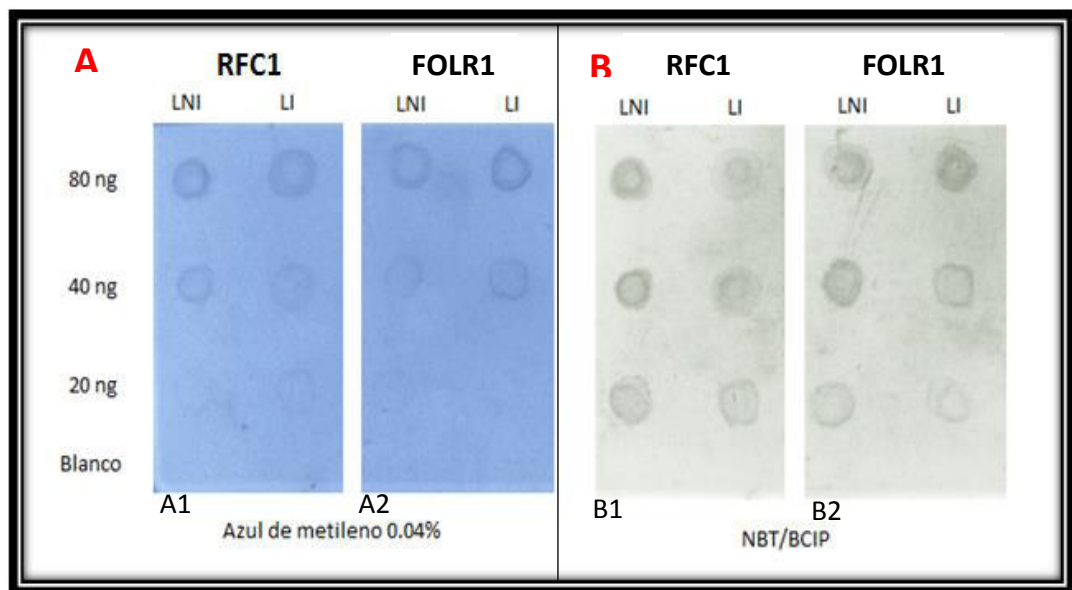
### 6.2.1.- Disminución en la metilación global del ADN

Para determinar si la pérdida de función de FOLR1 y RFC1 es capaz de afectar la metilación global del ADN como consecuencia de la ausencia del sustrato SAM originado en el ciclo del folato, es que se realizaron ensayos de *dot blot* sobre

membranas de nylon. De manera general, estos ensayos mostraron una reducción de la abundancia de 5mC presente en el ADN extraído de los embriones electroporados con los morfolinós.

Específicamente se observó una clara diferencia al comparar el LI con el morfolino RFC1spMO en donde la cantidad de ADN metilado se reduce de manera considerable comparado con el LNI del mismo grupo de embriones (**Fig. 14B1**). De manera similar, la abundancia de 5mC en embriones tratados con FolR1spMO mostró una clara diferencia entre el LI y el LNI (**Fig. 14B2**).

El control de carga por medio de la tinción con azul de metileno para el LI y LNI muestra una similaridad respecto a la cantidad de ADN sembrado en la membrana (**Fig. 14A**).



**Figura 14.- Dot Blot de ADN contra 5mC.** A.- La tinción con azul de metileno muestra que la cantidad de ADN sembrada del LNI y LI en las tres concentraciones son similares. B.- La presencia de la marca m5C se ve reducida en el LI en comparación con el LNI tanto para RFC1 como FOLR1. Adicionalmente se observa que en FOLR1 hay un mayor grado de reducción de la marca. LNI: Lado No Inyectado, LI: Lado Inyectado. RFC1: deficiencia del transportador RFC1. FOLR1: deficiencia del receptor FOLR1.



Para determinar de manera cuantitativa la reducción en la abundancia de 5mC, se realizó un análisis de intensidad de los dots en función de la cantidad de ADN sembrado. La abundancia relativa de 5mC en el ADN y el porcentaje de reducción se observan en la **TABLA N°4** y muestra que existe una clara reducción entre el LI y el LNI, debido a la deficiencia del transportador RFC1, la cual es de aproximadamente un 45.86%. Por otro lado, el análisis de abundancia en las muestras tratadas con el FolR1spMO muestra una reducción promedio de aproximadamente un 62.58%

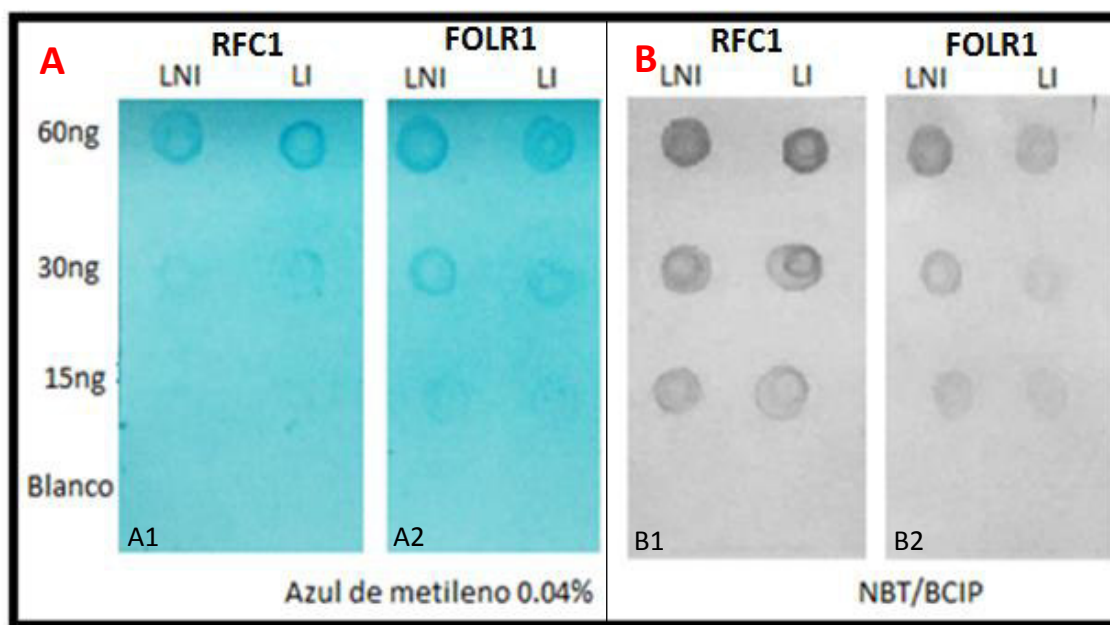
**TABLA N°4**

Abundancia Relativa (5mC/metblue)						
ng ADN	RFC1			FOLR1		
	LNI	LI	% Reducción	LNI	LI	% Reducción
20	18.72	10.19	45.57	38.94	14.65	62.38
40	10.79	5.89	45.44	20.90	6.24	70.13
80	4.45	2.38	46.58	8.50	3.80	55.25

#### 6.2.2.- Disminución en la metilación global del ARN

Con el fin de analizar si la pérdida de función de FOLR1 y RFC1 es capaz de afectar la metilación del ARN es que decidimos realizar ensayos de *dot blot* con un anticuerpo contra la marca m6A presente en el ARN. De manera general, nuestros resultados mostraron una reducción de la abundancia de m6A presente en el ARN total extraído de los embriones electroporados con los respectivos morfolidos (**Fig. 15**). Específicamente, pudimos determinar que la deficiencia del

receptor FOLR1 y RFC1 muestra una clara reducción en la cantidad de m6A (**Fig. 15B**). La tinción con azul de metilo para el control de carga muestra similaridad en las cantidades sembradas para las muestras provenientes del LI y el LNI del mismo grupo de embriones.



**Figura 15.- Dot Blot de ARN contra m6A.** La tinción con azul de metileno muestra que la cantidad de ARN sembrada del LNI y LI en las tres concentraciones son similares. B.- La presencia de la marca m6A se ve reducida en el LI en comparación con el LNI tanto para RFC1 como FOLR1. Adicionalmente se observa que en FOLR1 hay un mayor grado de reducción de la marca. LNI: Lado No Inyectado, LI: Lado Inyectado. RFC1: deficiencia del transportador RFC1. FOLR1: deficiencia del receptor FOLR1.

Para determinar de manera cuantitativa la reducción en la abundancia de m6A se realizó un análisis de intensidad de los dots en función de la cantidad de ARN sembrado. La intensidad relativa de m6A en el ARN y el porcentaje de reducción se muestran en la **TABLA N°5** donde se observa que la deficiencia del transportador RFC1 ha generado una mayor reducción de m6A cuyo porcentaje de reducción promedio fue del 48.26%. Mientras que la deficiencia del receptor FOLR1 muestra una reducción promedio de aproximadamente 40.45%.

**TABLA N°5**

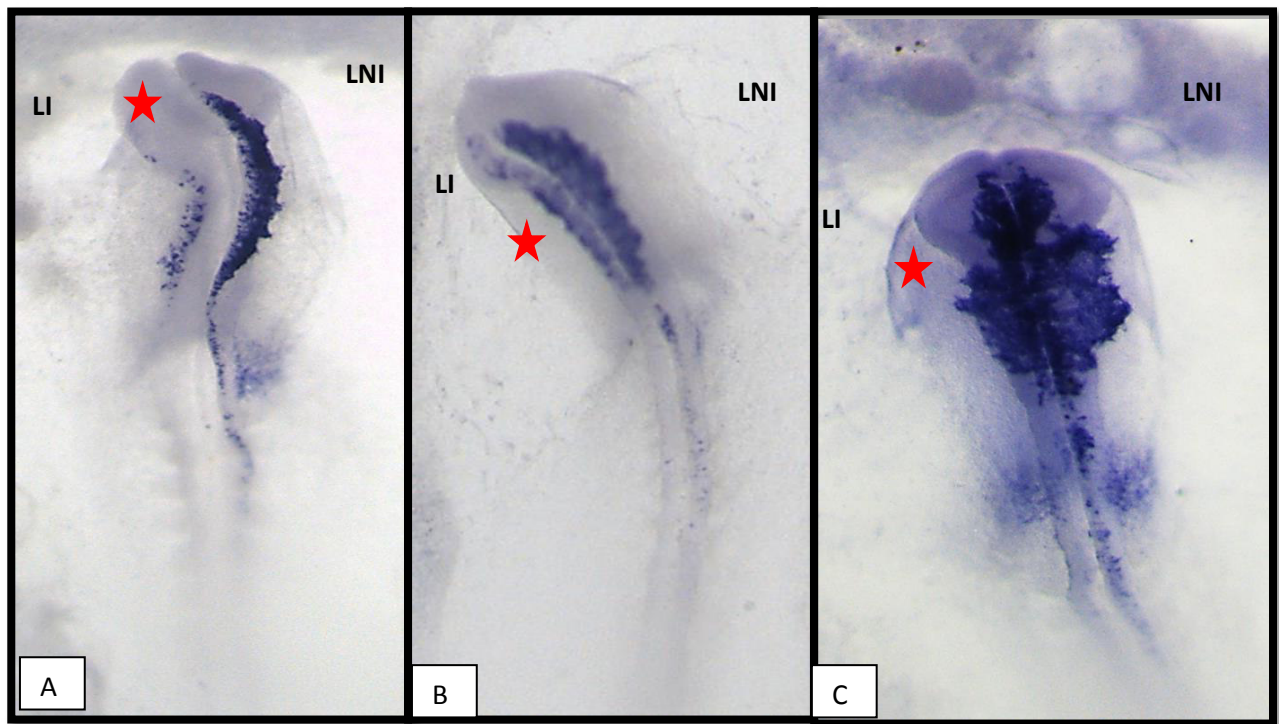
Abundancia Relativa (m6A/metblue)						
ng ARN	RFC1			FOLR1		
	LNI	LI	%Reducción	LNI	LI	%Reducción
15	8.18	4.36	46.66	4.31	2.74	36.42
30	4.02	2.70	32.78	3.41	1.69	50.58
60	2.39	0.83	65.35	2.52	1.65	34.35

Tomando en cuenta los resultados obtenidos podemos concluir que la deficiencia de RFC1 o FOLR1 generan una disminución en la metilación global de ADN a nivel de las 5mC y una disminución en la metilación del ARN a nivel de la m6A.

### 6.3.- Efecto de la deficiencia de FolR1 y RFC1 en el desarrollo de la Cresta Neural

Nuestros resultados muestran que la pérdida de función de FOLR1 y RFC1 es capaz de disminuir la abundancia en la metilación de ADN y ARN. Estas marcas epigenéticas han sido implicadas en diversos procesos relacionados con el desarrollo neural y de las células de la cresta neural (Bouzas et al., 2016; Hu et al., 2012; Hu et al., 2014; Strobl-Mazzulla et al., 2012; Strobl-Mazzulla et al., 2010). Para determinar si la pérdida de función de ambos genes afecta el desarrollo de las células de la cresta neural es que analizamos mediante hibridización *in situ* (HIS) el patrón de expresión del gen *Sox10*. Nuestros resultados muestran que la deficiencia del transportador RFC1 afecta la especificación de las células de la cresta neural (**Fig. 16**) debido a que se observa un menor número de células que expresan el marcador *Sox10* en el LI respecto a LNI. Adicionalmente, hay una variación en el fenotipo ya

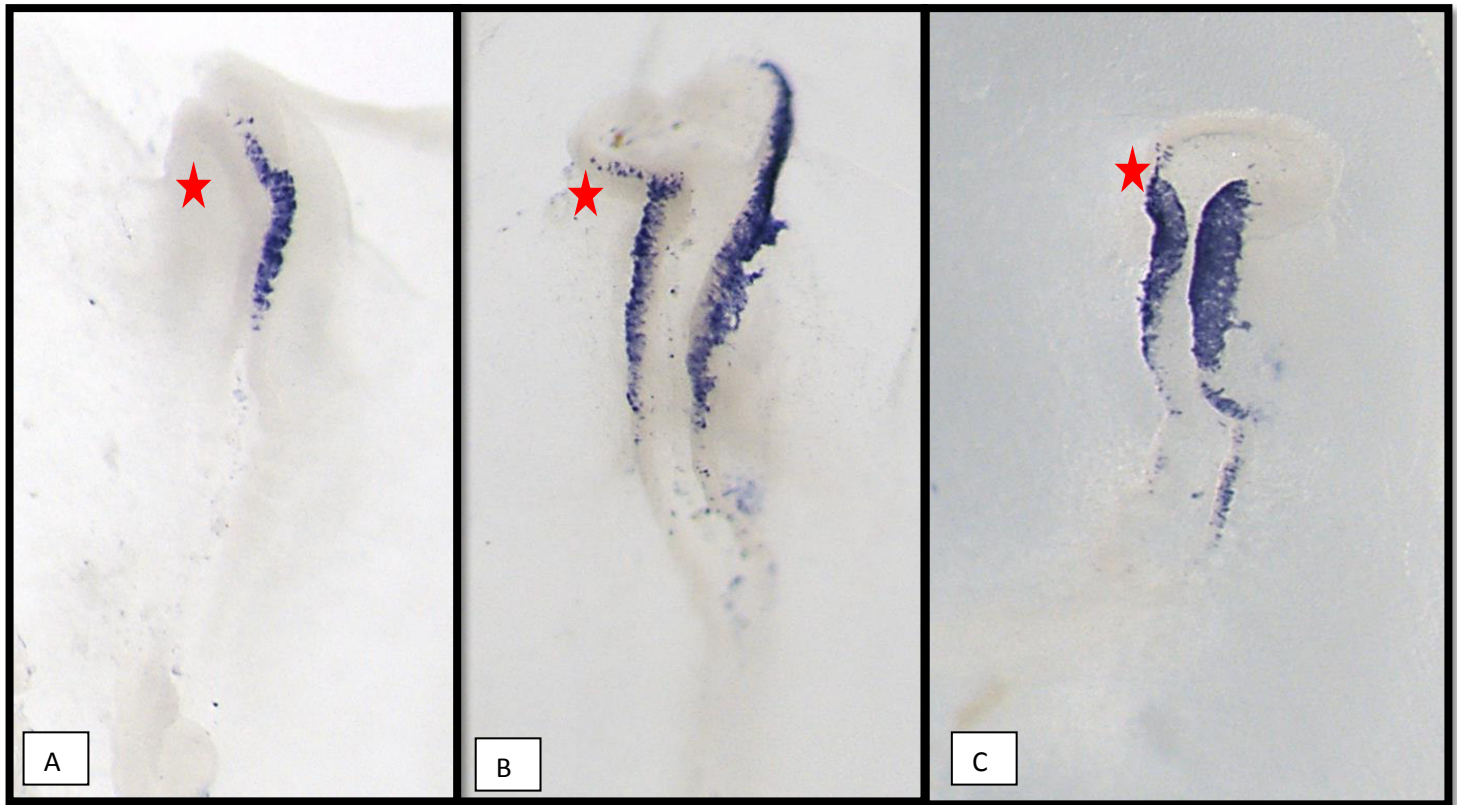
que hay embriones que presentan una expresión de *Sox10* muy baja (**Fig. 16A**), otras con una expresión intermedia (**Fig. 16B**) y otros con una expresión levemente reducida (**Fig. 16C**). A pesar de observarse un tipo de gradación en los tratamientos, no hay una expresión similar al lado no inyectado (control) en ningún caso.



**Figura 16.- Efecto de la pérdida de función de RFC1 sobre el desarrollo de las células de la cresta neural.** La electroporación del RFCspMO conduce a una disminución drástica (A), moderada (B) o leve (C) del marcador *Sox10* en el lado inyectado (LI) respecto al lado control no inyectado (LNI). La estrella muestra el lado inyectado con el morfolino.

De manera similar al tratamiento con el morfolino FOLR1spMo también mostraron una clara disminución en la expresión del marcador *Sox10* en LI respecto a LNI y dicha disminución también se dio en una gradación de fenotipos (**Fig. 17A-C**).

Tomados estos resultados en conjunto podemos decir que la deficiencia del transportador de folato RFC1 o del receptor de folato FOLR1 genera una alteración del desarrollo de las células de cresta neural que se evidencia por la disminución del número de células que expresan el marcador *Sox10* comparadas con el lado control.



**Figura 17.- Efecto de la pérdida de función de FOLR1 sobre el desarrollo de las células de la cresta neural.** La electroporación del FolR1spMO conduce a una disminución drástica (A), moderada (B) o leve (C) del marcador *Sox10* en el lado inyectado (LI) respecto al lado control no inyectado (LNI). La estrella marca el lado inyectado con el morfolino.

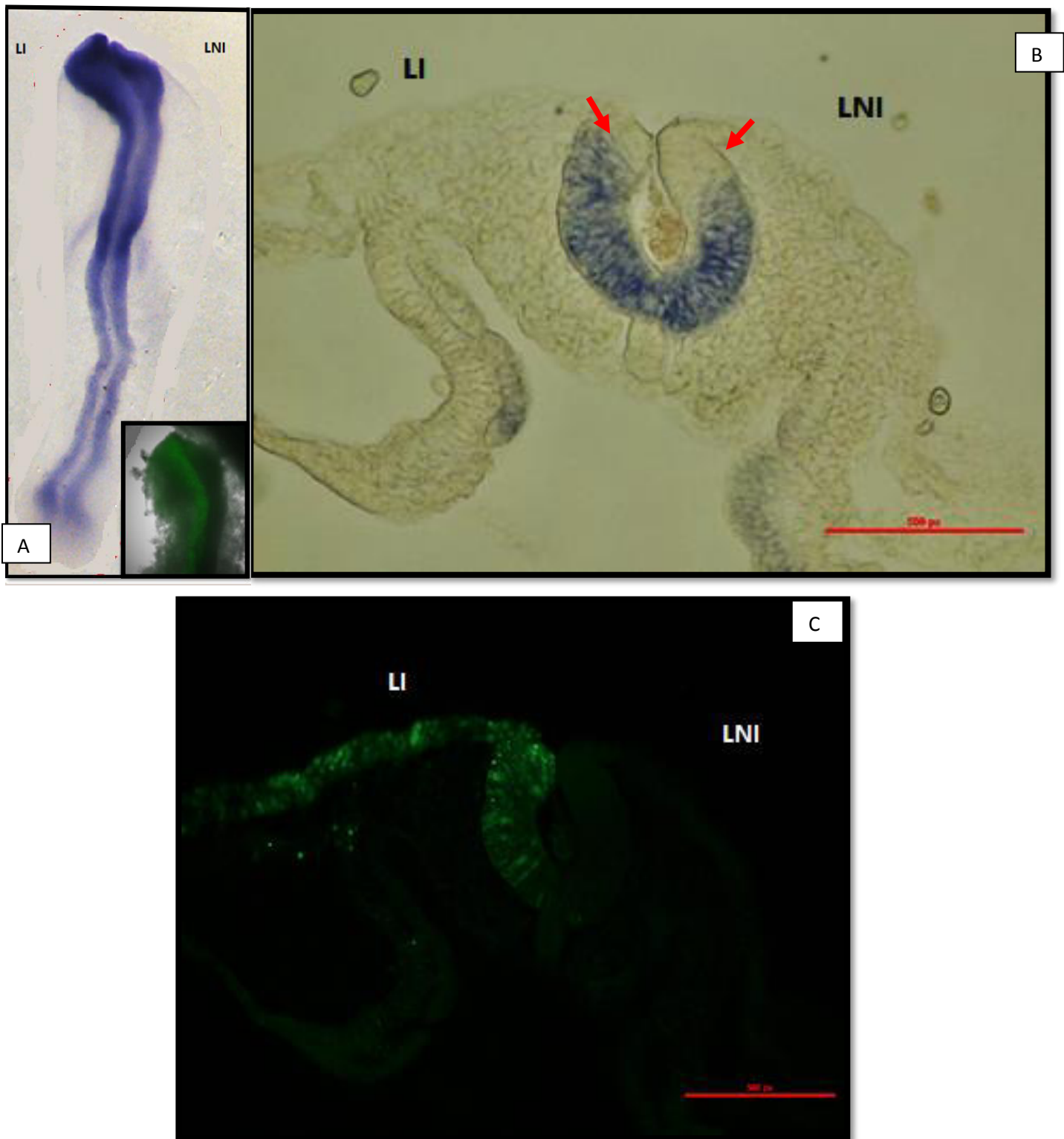
#### 6.4.- Efecto de la deficiencia de FolR1 y RFC1 en la especificación de las células neurales

Con el fin de determinar el rol de los transportadores de folato y su relación con la especificación neural es que realizamos ensayos de pérdida de función y analizamos mediante HIS la expresión del marcador neural *Sox2*. Las HIS realizadas para el marcador neural *Sox2* en los embriones electroporados con RFCspMO mostraron un leve incremento en la expresión de este gen en el LI respecto a lo observado en el lado control LNI (**Fig. 18A**). Para tener una mejor definición de lo que podía estar

sucediendo en el tubo neural, es que decidimos hacer cortes en criostato de estos embriones. El corte transversal de los embriones nos reveló que la expresión del marcador *Sox2* se extiende hasta regiones más dorsales en el LI (**Fig. 18B**), en donde normalmente se especifican las células de la cresta neural y este gen no se expresa (ver lado no inyectado).

Tomados estos datos en conjunto podemos hipotetizar que la deficiencia de RFC1 puede haber alterado el destino de las células del borde dorsal del tubo neural cambiando su destino de cresta neural a neural.





**Figura 18. Efecto de la deficiencia del transportador RFC1 en el desarrollo de la cresta neural. A.-** Se observa mayor expresión del gen *Sox2* en el tubo neural correspondiente al lado inyectado (LI) con RFC1spMO respecto al lado control no inyectado (LNI). **B.-** Corte transversal del embrión en A muestra que la expresión de *Sox2* se expande hasta el territorio dorsal del tubo neural donde normalmente se especifican las células de la cresta neural (ver flechas). **C.-** visualización del LI con morfolino RFCspMO mediante inmunohistoquímica contra FITC.

## 7.- DISCUSIÓN

### 7.1.- La deficiencia de los transportadores de folato (FOLR1 y RFC1) afecta la metilación del ADN y ARN

El transporte de folato hacia la célula se da por dos tipos de mecanismos: transportadores de folato (RFC1-SLC19A) o por medio de receptores de folato (FR, FOLR) (Antony, 1996; Farkas et al., 2013; Kelemen, 2006). Los folatos reducidos una vez que ingresan a las células por dichos transportadores y receptores funcionan como cofactores esenciales para la biosíntesis de purinas, pirimidinas - la conversión de uracilo (dUMP) a timidina (dTTP) - y para la metilación de ADN (De Marco et al., 2003; DeVos et al., 2008), ARN (T. Chen et al., 2015; Dominissini et al., 2012; Linder et al., 2015), de pri-microARN (Alarcon, Lee, et al., 2015; Berulava et al., 2015) y de proteínas. En este sentido, la deficiencia del ingreso de folato a nivel intracelular podría afectar una gran cantidad de procesos esenciales para la célula, entre los cuales podemos resaltar las regulaciones epigenéticas (Cridder et al., 2012), debido a la alteración de la homeostasis entre homocisteína-SAM (Beaudin & Stover, 2007) . En nuestro modelo, la alteración del ingreso de folato intracelular mediante el uso de los morfolinós RFCspMO y FolR1spMO estaría generando una elevación de homocisteína y una consiguiente reducción del SAM disponible como única fuente de grupos metilo para el establecimiento de marcas epigenéticas tales como la metilación (Hoffman, 1978; X. Wang et al., 2016). Esto fue claramente observado al analizar la metilación en 5mC del ADN y 6mA en el ARN, en donde ambas fueron consistentemente disminuidas al tratar los embriones con los morfolinós. De manera similar, se ha descrito -en humanos- que mutaciones presentes en diferentes enzimas del ciclo del folato como la metiltetrahidrofolato reductasa (MTHFR), la metionin sintasa reductasa (MTRR), y el propio transportador de folato reducido (RFC1) generan similares resultados en la disminución de la metilación genómica



(De Marco et al., 2003; Friso et al., 2002) como consecuencia del desbalance entre la homocisteína y el SAM (Padmanabhan et al., 2013; Pufulete et al., 2005).

Por otra parte, nuestros resultados demuestran que ante la pérdida de función de los transportadores de folato se observó una hipometilación en m6A de los ARNs totales. En estudios recientes se ha observado que la metilación del ARN interviene en el procesamiento, traducción, translocación y degradación del ARNm (Dominissini et al., 2012; Lin et al., 2016; Meyer et al., 2015) así como, en la biogénesis de los microARN. En este sentido, diversos trabajos han demostrado la importancia que tienen los microARN en el desarrollo neural y de las células de la cresta neural (Strobl-Mazzulla et al., 2012). Por ejemplo, se ha demostrado en *Xenopus* que la pérdida de función de Dicer, miR-200b, miR-96 y miR-196a conlleva a defectos severos en el desarrollo craneofacial como consecuencia de fallas en la inducción de las células de la cresta neural (Gessert, Bugner, Tecza, Pinker, & Kuhl, 2010). Es importante destacar que alteraciones en los microARNs capaces de regular alguna de las principales enzimas del ciclo del folato, tales como miR-34a y miR-24a, o que afectan la expresión de metiltransferasas de ADN, tales como miR-221 y miR-106 (Shookhoff & Gallicano, 2010), son también capaces de afectar el desarrollo de las células de la cresta neural. Otros estudios también han demostrado que la correcta biogénesis de determinados microRNA es esencial para el normal desarrollo de las CCN craneal y cardíacas. Particularmente, el miR-452 (uno de los microARNs más enriquecidos) cumple un rol importante en la regulación del gen Wnt5, necesario para la migración de las CCN (Sheehy et al., 2010).

Tomando en conjunto estos estudios, se revela un rol esencial de los microARNs durante el desarrollo de las CCN. Sin embargo, son necesarios estudios capaces de establecer la existencia de relaciones entre el control epigenético, la metilación del ARN y biogénesis de microARNs que sean capaces de influenciar la red regulatoria de genes importantes en el desarrollo de estas células.

## 7.2.- La pérdida de función de los transportadores de folato inducen un destino neural a expensas de las células de la cresta neural.

La deficiencia de folato, ya sea por polimorfismo en las enzimas del ciclo de folato (De Marco et al., 2003; Padmanabhan et al., 2013) o de las moléculas encargadas del transporte de folato hacia el interior celular (Piedrahita et al., 1999; Spiegelstein et al., 2004), ocasiona una gran variedad de defectos en su mayoría asociados al desarrollo neural y de las células de la cresta neural (Erickson, 2002; Lamprecht & Lipkin, 2003; Padmanabhan et al., 2013; Spiegelstein et al., 2004) (Lamprecht & Lipkin, 2003; Piedrahita et al., 1999). En nuestro estudio hemos demostrado que la deficiencia tanto del transportador RFC1 como del receptor FOLR1 de folato es capaz de alterar el desarrollo normal de las células de la cresta neural. Estos resultados también han sido observados en otros modelos como *Xenopus*, donde la expresión de RFC fue evidenciada en las células de la cresta neural (Li et al., 2011). En este mismo trabajo, la pérdida de función de RFC mediante la inyección de morfolinós genera una disminución en la expresión de los genes marcadores de cresta neural *Zic1*, *Snail1/2*, *FoxD3* y *Twist1*, así como también se ven afectados los patrones de migración de las células de la cresta neural. Estas alteraciones conllevaron a defectos craneofaciales, cardíacos, hipopigmentación y malformaciones del intestino; siendo todas neurocristopatías encontradas en humanos. Además, la disminución de la expresión de RFC genera una reducción en la abundancia de H3K4me3 (Li et al., 2011), cuya marca es altamente enriquecida en las regiones flanqueantes y codificantes de *FoxD3*, *Zic1*, *Twist1* y *Snail2* de distintas especies de vertebrados. Esto sugiere que la expresión de estos genes puede depender en gran medida de las regulaciones epigenéticas, lo cual está en concordancia con los resultados obtenidos en nuestro trabajo.

Por otra parte, la alteración del receptor FOLR1 en ratones genera una disminución en el número de somitas así como una falta en la expresión del marcador *Pax3* necesario para promover el desarrollo de la cresta neural y que finalmente conlleva a malformaciones craneofaciales, cardíacas y defectos del tubo neural (Li et al., 2011; Tang & Finnell, 2003) como se observa en *Xenopus*.

Nuestros resultados demuestran que la pérdida de función de los transportadores de folato lleva a una disminución de la metilación global del ADN (**Fig.14**). Estudios previos ya han demostrado la importancia de la metilación del ADN, particularmente caracterizando las metiltransferasas de ADN (DNMT), relacionadas con el control de la expresión de genes importantes para la especificación y migración de las células de la cresta neural (Hu et al., 2012; Hu et al., 2014). Específicamente, estos trabajos realizados en embriones de pollo han demostrado que la metiltransferasa *de novo* DNMT3A se expresan en el borde de la placa neural y luego en las células de la cresta neural premigratorias. La pérdida de función de la DNMT3A lleva a una disminución de la expresión de genes especificadores de la cresta neural, tales como *Sox10*, *FoxD3*, *Snail2* y *Sox9*; y contrariamente lleva a un aumento de la expresión de marcadores neurales como *Sox2*, *Sox3* y *Zic1* en los progenitores del tubo neural dorsal (Hu et al., 2012). Se sabe que *Sox2* es un factor de transcripción que se expresa en células madre neurales embrionarias. Así mismo, *Sox2* está involucrado en el mantenimiento de las células madre neurales que incluye la proliferación, supervivencia, auto renovación y neurogénesis, es decir, cumple un rol importante durante el desarrollo neural. Por lo tanto, estos resultados son consistentes con nuestras observaciones donde la expresión de *Sox2* se extiende hasta el territorio de las células de la cresta neural en el borde de los pliegues neurales, generando un cambio en el destino de dichos progenitores.

De manera similar, la metiltransferasa *de novo* DNMT3B se expresa en la placa neural y sus bordes en el estadio de gástrula de embriones de pollo; y luego se expresa en el tubo neural y cresta neural migratoria. La pérdida de función de la DNMT3B, mediante la electroporación de morfolidos, lleva a un aumento en la expresión de genes especificadores de la cresta neural y a un exceso en la producción de células migratorias, aún en estadios en donde las mismas ya han cesado su delaminación (Hu et al., 2014). Tomados estos trabajos en conjunto demuestran la importancia de la metilación del ADN en la especificación de las CCN. Por lo tanto, no es sorprendente que la deficiencia de RFC1 y FOLR1, y la consecuente disminución en los niveles del sustrato de metilación SAM, puedan generar un fenotipo similar a los resultados observados por la pérdida de función de las DNMT3A/B.

Otro aspecto a tener en cuenta es que se ha demostrado que los genes claves asociados al desarrollo presentan un alto contenido de CpG en sus regiones regulatorias (Saxonov, Berg, & Brutlag, 2006). En ese sentido, el locus *Sox2* posee un promotor y una región codificante enteramente inmersa en una isla CpG (Alonso et al., 2011; Amaral et al., 2009; Shahryari et al., 2014). Este promotor se encuentra hipometilado en células madre de tumores cerebrales lo que genera una sobreexpresión de *Sox2* (Alonso et al., 2011).

Adicionalmente, se ha demostrado que el promotor de *Sox2* presenta marcas epigenéticas bivalentes (H3K4me3 y H3K27me3) (Bernstein et al., 2006; Mikkelsen et al., 2007). Durante el desarrollo embrionario estas marcas son resueltas ya sea manteniendo la marca activadora (H3K4me3) o represora (H3K27me3) dependiendo del tipo celular (Mikkelsen et al., 2007). Por lo tanto, un desbalance en la metilación de estas histonas también podría ser una de las causas que conlleva a la expresión de *Sox2* en el territorio de la cresta neural.

## **8.- CONCLUSIONES**

- La deficiencia del transportador de folato RFC1 y del receptor de folato FolR1 generan alteraciones en la metilación global del ADN y ARN.
- La deficiencia de los transportadores de folato RFC1 y FolR1 generan una reducción de la población de células de la cresta neural.
- La deficiencia de los transportadores de folato RFC1 y FolR1 genera un cambio en el destino celular de las células de la cresta neural hacia un destino neural a través de mecanismo epigenéticos.

## **9.- RECOMENDACIONES**

- Los resultados obtenidos durante esta tesis abren la interrogante de las posibles funciones de la marca m6A en el ARN durante el desarrollo temprano, así como su influencia en el dinamismo de los ARN. De igual modo esta tesis podría sentar las bases para tener un mejor entendimiento y desarrollar posibles tratamientos capaces de prevenir o disminuir las anomalías ocasionadas como consecuencia de la deficiencia de folato en mujeres embarazadas.

## 10.- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alarcon, C. R., Goodarzi, H., Lee, H., Liu, X., Tavazoie, S., & Tavazoie, S. F. (2015). HNRNPA2B1 Is a Mediator of m(6)A-Dependent Nuclear RNA Processing Events. *Cell*, 162(6), 1299-1308. doi: 10.1016/j.cell.2015.08.011
- Alarcon, C. R., Lee, H., Goodarzi, H., Halberg, N., & Tavazoie, S. F. (2015). N6-methyladenosine marks primary microRNAs for processing. *Nature*, 519(7544), 482-485. doi: 10.1038/nature14281
- Alonso, M. M., Diez-Valle, R., Manterola, L., Rubio, A., Liu, D., Cortes-Santiago, N., . . . Gomez-Manzano, C. (2011). Genetic and epigenetic modifications of Sox2 contribute to the invasive phenotype of malignant gliomas. *PLoS One*, 6(11), e26740. doi: 10.1371/journal.pone.0026740
- Amaral, P. P., Neyt, C., Wilkins, S. J., Askarian-Amiri, M. E., Sunkin, S. M., Perkins, A. C., & Mattick, J. S. (2009). Complex architecture and regulated expression of the Sox2ot locus during vertebrate development. *RNA*, 15(11), 2013-2027. doi: 10.1261/rna.1705309
- Antony, A. C. (1996). Folate receptors. *Annu Rev Nutr*, 16, 501-521. doi: 10.1146/annurev.nu.16.070196.002441
- Antony, A. C., & Hansen, D. K. (2000). Hypothesis: folate-responsive neural tube defects and neurocristopathies. *Teratology*, 62(1), 42-50. doi: 10.1002/1096-9926(200007)62:1<42::AID-TERA9>3.0.CO;2-U
- Avvakumov, G. V., Walker, J. R., Xue, S., Li, Y., Duan, S., Bronner, C., . . . Dhe-Paganon, S. (2008). Structural basis for recognition of hemi-methylated DNA by the SRA domain of human UHRF1. *Nature*, 455(7214), 822-825. doi: 10.1038/nature07273
- Basch, M. L., Garcia-Castro, M. I., & Bronner-Fraser, M. (2004). Molecular mechanisms of neural crest induction. *Birth Defects Res C Embryo Today*, 72(2), 109-123. doi: 10.1002/bdrc.20015
- Batista, P. J., Molinie, B., Wang, J., Qu, K., Zhang, J., Li, L., . . . Chang, H. Y. (2014). m(6)A RNA modification controls cell fate transition in mammalian embryonic stem cells. *Cell Stem Cell*, 15(6), 707-719. doi: 10.1016/j.stem.2014.09.019
- Beaudin, A. E., & Stover, P. J. (2007). Folate-mediated one-carbon metabolism and neural tube defects: balancing genome synthesis and gene expression. *Birth Defects Res C Embryo Today*, 81(3), 183-203. doi: 10.1002/bdrc.20100
- Benish, B. M. (1975). Letter: "The neurocristopathies: a unifying concept of disease arising in neural crest development". *Hum Pathol*, 6(1), 128.
- Bernstein, B. E., Mikkelsen, T. S., Xie, X., Kamal, M., Huebert, D. J., Cuff, J., . . . Lander, E. S. (2006). A bivalent chromatin structure marks key developmental genes in embryonic stem cells. *Cell*, 125(2), 315-326. doi: 10.1016/j.cell.2006.02.041
- Berulava, T., Rahmann, S., Rademacher, K., Klein-Hitpass, L., & Horsthemke, B. (2015). N6-adenosine methylation in MiRNAs. *PLoS One*, 10(2), e0118438. doi: 10.1371/journal.pone.0118438
- Betancur, P., Bronner-Fraser, M., & Sauka-Spengler, T. (2010). Assembling neural crest regulatory circuits into a gene regulatory network. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 26, 581-603. doi: 10.1146/annurev.cellbio.042308.113245
- Blom, H. J. (2009). Folic acid, methylation and neural tube closure in humans. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*, 85(4), 295-302. doi: 10.1002/bdra.20581
- Blom, H. J., Shaw, G. M., den Heijer, M., & Finnell, R. H. (2006). Neural tube defects and folate: case far from closed. *Nat Rev Neurosci*, 7(9), 724-731. doi: 10.1038/nrn1986
- Bohnsack, B. L., & Hirschi, K. K. (2004). Nutrient regulation of cell cycle progression. *Annu Rev Nutr*, 24, 433-453. doi: 10.1146/annurev.nutr.23.011702.073203
- Bolande, R. P. (1997). Neurocristopathy: its growth and development in 20 years. *Pediatr Pathol Lab Med*, 17(1), 1-25.

- Bouzas, S. O., Marini, M. S., Torres Zelada, E., Buzzi, A. L., Morales Vicente, D. A., & Strobl-Mazzulla, P. H. (2016). Epigenetic activation of Sox2 gene in the developing vertebrate neural plate. *Mol Biol Cell*, 27(12), 1921-1927. doi: 10.1091/mbc.E16-01-0042
- Colas, J. F., & Schoenwolf, G. C. (2001). Towards a cellular and molecular understanding of neurulation. *Dev Dyn*, 221(2), 117-145. doi: 10.1002/dvdy.1144
- Cooper, T. A. (2012). Implications of widespread covalent modification of mRNA. *Circ Res*, 111(12), 1491-1493. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.112.281071
- Crider, K. S., Yang, T. P., Berry, R. J., & Bailey, L. B. (2012). Folate and DNA methylation: a review of molecular mechanisms and the evidence for folate's role. *Adv Nutr*, 3(1), 21-38. doi: 10.3945/an.111.000992
- Chen, B.-F., & Chan, W.-Y. (2014). The de novo DNA methyltransferase DNMT3A in development and cancer. *Epigenetics*, 9(5), 669-677. doi: 10.4161/epi.28324
- Chen, T., Hao, Y. J., Zhang, Y., Li, M. M., Wang, M., Han, W., . . . Zhou, Q. (2015). m(6)A RNA methylation is regulated by microRNAs and promotes reprogramming to pluripotency. *Cell Stem Cell*, 16(3), 289-301. doi: 10.1016/j.stem.2015.01.016
- Choi, S. W., Friso, S., Keyes, M. K., & Mason, J. B. (2005). Folate supplementation increases genomic DNA methylation in the liver of elder rats. *Br J Nutr*, 93(1), 31-35.
- De Marco, P., Calevo, M. G., Moroni, A., Merello, E., Raso, A., Finnell, R. H., . . . Capra, V. (2003). Reduced folate carrier polymorphism (80A-->G) and neural tube defects. *Eur J Hum Genet*, 11(3), 245-252. doi: 10.1038/sj.ejhg.5200946
- Denis, H., Ndlovu, M. N., & Fuks, F. (2011). Regulation of mammalian DNA methyltransferases: a route to new mechanisms. *EMBO Rep*, 12(7), 647-656. doi: 10.1038/embor.2011.110
- DeVos, L., Chanson, A., Liu, Z., Ciappio, E. D., Parnell, L. D., Mason, J. B., . . . Crott, J. W. (2008). Associations between single nucleotide polymorphisms in folate uptake and metabolizing genes with blood folate, homocysteine, and DNA uracil concentrations. *Am J Clin Nutr*, 88(4), 1149-1158.
- Dominissini, D., Moshitch-Moshkovitz, S., Schwartz, S., Salmon-Divon, M., Ungar, L., Osenberg, S., . . . Rechavi, G. (2012). Topology of the human and mouse m6A RNA methylomes revealed by m6A-seq. *Nature*, 485(7397), 201-206. doi: 10.1038/nature11112
- Erickson, J. D. (2002). Folic acid and prevention of spina bifida and anencephaly. 10 years after the U.S. Public Health Service recommendation. *MMWR Recomm Rep*, 51(RR-13), 1-3.
- Farkas, S. A., Bottiger, A. K., Isaksson, H. S., Finnell, R. H., Ren, A., & Nilsson, T. K. (2013). Epigenetic alterations in folate transport genes in placental tissue from fetuses with neural tube defects and in leukocytes from subjects with hyperhomocysteinemia. *Epigenetics*, 8(3), 303-316. doi: 10.4161/epi.23988
- Fazzari, M. J., & Greally, J. M. (2010). Introduction to epigenomics and epigenome-wide analysis. *Methods Mol Biol*, 620, 243-265. doi: 10.1007/978-1-60761-580-4\_7
- Finnegan, E. F., & Pasquinelli, A. E. (2013). MicroRNA biogenesis: regulating the regulators. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 48(1), 51-68. doi: 10.3109/10409238.2012.738643
- Finnell, R. H., Greer, K. A., Barber, R. C., & Piedrahita, J. A. (1998). Neural tube and craniofacial defects with special emphasis on folate pathway genes. *Crit Rev Oral Biol Med*, 9(1), 38-53.
- Friso, S., Choi, S. W., Girelli, D., Mason, J. B., Dolnikowski, G. G., Bagley, P. J., . . . Selhub, J. (2002). A common mutation in the 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase gene affects genomic DNA methylation through an interaction with folate status. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(8), 5606-5611. doi: 10.1073/pnas.062066299
- Gessert, S., Bugner, V., Tecza, A., Pinker, M., & Kuhl, M. (2010). FMR1/FXR1 and the miRNA pathway are required for eye and neural crest development. *Dev Biol*, 341(1), 222-235. doi: 10.1016/j.ydbio.2010.02.031
- Groves, A. K., & LaBonne, C. (2014). Setting appropriate boundaries: fate, patterning and competence at the neural plate border. *Dev Biol*, 389(1), 2-12. doi: 10.1016/j.ydbio.2013.11.027

- Hall, B. K. (2000). The neural crest as a fourth germ layer and vertebrates as quadroblastic not triploblastic. *Evol Dev*, 2(1), 3-5.
- Hall, B. K. (2008). The neural crest and neural crest cells: discovery and significance for theories of embryonic organization. *J Biosci*, 33(5), 781-793.
- Hamburger, V., & Hamilton, H. L. (1951). A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J Morphol*, 88(1), 49-92.
- Hatakeyama, J., & Shimamura, K. (2008). Method for electroporation for the early chick embryo. *Dev Growth Differ*, 50(6), 449-452. doi: 10.1111/j.1440-169X.2008.01040.x
- Hoffman, J. L. (1978). Biosynthesis of S-N<sup>6</sup>-methyladenosylhomocysteine, an inhibitor of RNA methyltransferases. *Journal of Biological Chemistry*, 253(9), 2905-2907.
- Hu, N., Strobl-Mazzulla, P., Sauka-Spengler, T., & Bronner, M. E. (2012). DNA methyltransferase3A as a molecular switch mediating the neural tube-to-neural crest fate transition. *Genes Dev*, 26(21), 2380-2385. doi: 10.1101/gad.198747.112
- Hu, N., Strobl-Mazzulla, P. H., Simoes-Costa, M., Sanchez-Vasquez, E., & Bronner, M. E. (2014). DNA methyltransferase 3B regulates duration of neural crest production via repression of Sox10. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111(50), 17911-17916. doi: 10.1073/pnas.1318408111
- Iskandar, B. J., Rizk, E., Meier, B., Hariharan, N., Bottiglieri, T., Finnell, R. H., . . . Hogan, K. J. (2010). Folate regulation of axonal regeneration in the rodent central nervous system through DNA methylation. *J Clin Invest*, 120(5), 1603-1616. doi: 10.1172/JCI40000
- Kelemen, L. E. (2006). The role of folate receptor alpha in cancer development, progression and treatment: cause, consequence or innocent bystander? *Int J Cancer*, 119(2), 243-250. doi: 10.1002/ijc.21712
- Keller, R., Davidson, L., Edlund, A., Elul, T., Ezin, M., Shook, D., & Skoglund, P. (2000). Mechanisms of convergence and extension by cell intercalation. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 355(1399), 897-922. doi: 10.1098/rstb.2000.0626
- Khudyakov, J., & Bronner-Fraser, M. (2009). Comprehensive spatiotemporal analysis of early chick neural crest network genes. *Dev Dyn*, 238(3), 716-723. doi: 10.1002/dvdy.21881
- Kundu, S., & Peterson, C. L. (2009). Role of chromatin states in transcriptional memory. *Biochim Biophys Acta*, 1790(6), 445-455. doi: 10.1016/j.bbagen.2009.02.009
- Kur, E., Mecklenburg, N., Cabrera, R. M., Willnow, T. E., & Hammes, A. (2014). LRP2 mediates folate uptake in the developing neural tube. *J Cell Sci*, 127(Pt 10), 2261-2268. doi: 10.1242/jcs.140145
- Lamprecht, S. A., & Lipkin, M. (2003). Chemoprevention of colon cancer by calcium, vitamin D and folate: molecular mechanisms. *Nat Rev Cancer*, 3(8), 601-614. doi: 10.1038/nrc1144
- Lawson, A., Anderson, H., & Schoenwolf, G. C. (2001). Cellular mechanisms of neural fold formation and morphogenesis in the chick embryo. *Anat Rec*, 262(2), 153-168.
- Lee, M. S., Bonner, J. R., Bernard, D. J., Sanchez, E. L., Sause, E. T., Prentice, R. R., . . . Brody, L. C. (2012). Disruption of the folate pathway in zebrafish causes developmental defects. *BMC Dev Biol*, 12, 12. doi: 10.1186/1471-213X-12-12
- Li, J., Shi, Y., Sun, J., Zhang, Y., & Mao, B. (2011). Xenopus reduced folate carrier regulates neural crest development epigenetically. *PLoS One*, 6(11), e27198. doi: 10.1371/journal.pone.0027198
- Lin, S., Choe, J., Du, P., Triboulet, R., & Gregory, R. I. (2016). The m(6)A Methyltransferase METTL3 Promotes Translation in Human Cancer Cells. *Mol Cell*, 62(3), 335-345. doi: 10.1016/j.molcel.2016.03.021
- Linder, B., Grozhik, A. V., Olarerin-George, A. O., Meydan, C., Mason, C. E., & Jaffrey, S. R. (2015). Single-nucleotide-resolution mapping of m6A and m6Am throughout the transcriptome. *Nat Methods*, 12(8), 767-772. doi: 10.1038/nmeth.3453
- Liu, J., Yue, Y., Han, D., Wang, X., Fu, Y., Zhang, L., . . . He, C. (2014). A METTL3-METTL14 complex mediates mammalian nuclear RNA N<sup>6</sup>-adenosine methylation. *Nat Chem Biol*, 10(2), 93-95. doi: 10.1038/nchembio.1432



- Maddox, D. M., Manlapat, A., Roon, P., Prasad, P., Ganapathy, V., & Smith, S. B. (2003). Reduced-folate carrier (RFC) is expressed in placenta and yolk sac, as well as in cells of the developing forebrain, hindbrain, neural tube, craniofacial region, eye, limb buds and heart. *BMC Dev Biol*, 3, 6. doi: 10.1186/1471-213X-3-6
- Meulemans, D., & Bronner-Fraser, M. (2004). Gene-regulatory interactions in neural crest evolution and development. *Dev Cell*, 7(3), 291-299. doi: 10.1016/j.devcel.2004.08.007
- Meyer, K. D., Patil, D. P., Zhou, J., Zinoviev, A., Skabkin, M. A., Elemento, O., . . . Jaffrey, S. R. (2015). 5' UTR m(6)A Promotes Cap-Independent Translation. *Cell*, 163(4), 999-1010. doi: 10.1016/j.cell.2015.10.012
- Meyer, K. D., Saletore, Y., Zumbo, P., Elemento, O., Mason, C. E., & Jaffrey, S. R. (2012). Comprehensive analysis of mRNA methylation reveals enrichment in 3' UTRs and near stop codons. *Cell*, 149(7), 1635-1646. doi: 10.1016/j.cell.2012.05.003
- Mikkelsen, T. S., Ku, M., Jaffe, D. B., Issac, B., Lieberman, E., Giannoukos, G., . . . Bernstein, B. E. (2007). Genome-wide maps of chromatin state in pluripotent and lineage-committed cells. *Nature*, 448(7153), 553-560. doi: 10.1038/nature06008
- Miranda, T. B., & Jones, P. A. (2007). DNA methylation: the nuts and bolts of repression. *J Cell Physiol*, 213(2), 384-390. doi: 10.1002/jcp.21224
- Nieto, M. A. (2001). The early steps of neural crest development. *Mech Dev*, 105(1-2), 27-35.
- Obican, S. G., Finnell, R. H., Mills, J. L., Shaw, G. M., & Scialli, A. R. (2010). Folic acid in early pregnancy: a public health success story. *FASEB J*, 24(11), 4167-4174. doi: 10.1096/fj.10-165084
- Padmanabhan, N., Jia, D., Geary-Joo, C., Wu, X., Ferguson-Smith, A. C., Fung, E., . . . Watson, E. D. (2013). Mutation in folate metabolism causes epigenetic instability and transgenerational effects on development. *Cell*, 155(1), 81-93. doi: 10.1016/j.cell.2013.09.002
- Parchem, R. J., Moore, N., Fish, J. L., Parchem, J. G., Braga, T. T., Shenoy, A., . . . Belloch, R. (2015). miR-302 Is Required for Timing of Neural Differentiation, Neural Tube Closure, and Embryonic Viability. *Cell Rep*, 12(5), 760-773. doi: 10.1016/j.celrep.2015.06.074
- Parker, R., & Sheth, U. (2007). P bodies and the control of mRNA translation and degradation. *Mol Cell*, 25(5), 635-646. doi: 10.1016/j.molcel.2007.02.011
- Piedrahita, J. A., Oetama, B., Bennett, G. D., van Waes, J., Kamen, B. A., Richardson, J., . . . Finnell, R. H. (1999). Mice lacking the folic acid-binding protein Folbp1 are defective in early embryonic development. *Nat Genet*, 23(2), 228-232. doi: 10.1038/13861
- Pufulete, M., Al-Ghnaniem, R., Rennie, J. A., Appleby, P., Harris, N., Gout, S., . . . Sanders, T. A. (2005). Influence of folate status on genomic DNA methylation in colonic mucosa of subjects without colorectal adenoma or cancer. *Br J Cancer*, 92(5), 838-842. doi: 10.1038/sj.bjc.6602439
- Rada-Iglesias, A., & Wysocka, J. (2011). Epigenomics of human embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells: insights into pluripotency and implications for disease. *Genome Med*, 3(6), 36. doi: 10.1186/gm252
- Robertson, K. D. (2005). DNA methylation and human disease. *Nat Rev Genet*, 6(8), 597-610. doi: 10.1038/nrg1655
- Rose, N. R., & Klose, R. J. (2014). Understanding the relationship between DNA methylation and histone lysine methylation. *Biochim Biophys Acta*, 1839(12), 1362-1372. doi: 10.1016/j.bbagr.2014.02.007
- Roundtree, I. A., & He, C. (2016). Nuclear m(6)A Reader YTHDC1 Regulates mRNA Splicing. *Trends Genet*, 32(6), 320-321. doi: 10.1016/j.tig.2016.03.006
- Sadler, T. W. (2005). Embryology of neural tube development. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*, 135C(1), 2-8. doi: 10.1002/ajmg.c.30049
- Sasai, Y., Lu, B., Steinbeisser, H., & De Robertis, E. M. (1995). Regulation of neural induction by the Chd and Bmp-4 antagonistic patterning signals in *Xenopus*. *Nature*, 376(6538), 333-336. doi: 10.1038/376333a0

- Sauka-Spengler, T., & Bronner-Fraser, M. (2008). A gene regulatory network orchestrates neural crest formation. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9(7), 557-568. doi: 10.1038/nrm2428
- Saxonov, S., Berg, P., & Brutlag, D. L. (2006). A genome-wide analysis of CpG dinucleotides in the human genome distinguishes two distinct classes of promoters. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(5), 1412-1417. doi: 10.1073/pnas.0510310103
- Shahryari, A., Rafiee, M. R., Fouani, Y., Oliaie, N. A., Samaei, N. M., Shafiee, M., . . . Mowla, S. J. (2014). Two novel splice variants of SOX2OT, SOX2OT-S1, and SOX2OT-S2 are coupled with SOX2 and OCT4 in esophageal squamous cell carcinoma. *Stem Cells*, 32(1), 126-134. doi: 10.1002/stem.1542
- Shookhoff, J. M., & Gallicano, G. I. (2010). A new perspective on neural tube defects: folic acid and microRNA misexpression. *Genesis*, 48(5), 282-294. doi: 10.1002/dvg.20623
- Simoies-Costa, M., & Bronner, M. E. (2015). Establishing neural crest identity: a gene regulatory recipe. *Development*, 142(2), 242-257. doi: 10.1242/dev.105445
- Smith, Z. D., & Meissner, A. (2013). DNA methylation: roles in mammalian development. *Nat Rev Genet*, 14(3), 204-220. doi: 10.1038/nrg3354
- Spiegelstein, O., Mitchell, L. E., Merriweather, M. Y., Wicker, N. J., Zhang, Q., Lammer, E. J., & Finnell, R. H. (2004). Embryonic development of folate binding protein-1 (Folbp1) knockout mice: Effects of the chemical form, dose, and timing of maternal folate supplementation. *Dev Dyn*, 231(1), 221-231. doi: 10.1002/dvdy.20107
- Strobl-Mazzulla, P. H., & Bronner, M. E. (2012). A PHD12-Snail2 repressive complex epigenetically mediates neural crest epithelial-to-mesenchymal transition. *J Cell Biol*, 198(6), 999-1010. doi: 10.1083/jcb.201203098
- Strobl-Mazzulla, P. H., Marini, M., & Buzzi, A. (2012). Epigenetic landscape and miRNA involvement during neural crest development. *Dev Dyn*, 241(12), 1849-1856. doi: 10.1002/dvdy.23868
- Strobl-Mazzulla, P. H., Sauka-Spengler, T., & Bronner-Fraser, M. (2010). Histone demethylase Jmjd2A regulates neural crest specification. *Dev Cell*, 19(3), 460-468. doi: 10.1016/j.devcel.2010.08.009
- Suzuki, M. M., & Bird, A. (2008). DNA methylation landscapes: provocative insights from epigenomics. *Nat Rev Genet*, 9(6), 465-476. doi: 10.1038/nrg2341
- Tang, L. S., & Finnell, R. H. (2003). Neural and orofacial defects in Folp1 knockout mice [corrected]. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*, 67(4), 209-218. doi: 10.1002/bdra.10045
- Thomson, M., Liu, S. J., Zou, L. N., Smith, Z., Meissner, A., & Ramanathan, S. (2011). Pluripotency factors in embryonic stem cells regulate differentiation into germ layers. *Cell*, 145(6), 875-889. doi: 10.1016/j.cell.2011.05.017
- van Rooij, I. A., Ocke, M. C., Straatman, H., Zielhuis, G. A., Merkus, H. M., & Steegers-Theunissen, R. P. (2004). Periconceptional folate intake by supplement and food reduces the risk of nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate. *Prev Med*, 39(4), 689-694. doi: 10.1016/j.ypmed.2004.02.036
- Voiculescu, O., Papanayotou, C., & Stern, C. D. (2008). Spatially and temporally controlled electroporation of early chick embryos. *3(3)*, 419-426. doi: 10.1038/nprot.2008.10
- Wang, P., Doxtader, K. A., & Nam, Y. (2016). Structural Basis for Cooperative Function of Mettl3 and Mettl14 Methyltransferases. *Mol Cell*, 63(2), 306-317. doi: 10.1016/j.molcel.2016.05.041
- Wang, X., Feng, J., Xue, Y., Guan, Z., Zhang, D., Liu, Z., . . . Yin, P. (2016). Structural basis of N(6)-adenosine methylation by the METTL3-METTL14 complex. *Nature*, 534(7608), 575-578. doi: 10.1038/nature18298
- Wang, X., Lu, Z., Gomez, A., Hon, G. C., Yue, Y., Han, D., . . . He, C. (2014). N6-methyladenosine-dependent regulation of messenger RNA stability. *Nature*, 505(7481), 117-120. doi: 10.1038/nature12730
- Warren, S. T. (2007). The epigenetics of fragile X syndrome. *Cell Stem Cell*, 1(5), 488-489.

- Wilkie, A. O., & Morriss-Kay, G. M. (2001). Genetics of craniofacial development and malformation. *Nat Rev Genet*, 2(6), 458-468. doi: 10.1038/35076601
- Wilson, S. I., Graziano, E., Harland, R., Jessell, T. M., & Edlund, T. (2000). An early requirement for FGF signalling in the acquisition of neural cell fate in the chick embryo. *Curr Biol*, 10(8), 421-429.
- Winter, J., Jung, S., Keller, S., Gregory, R. I., & Diederichs, S. (2009). Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nat Cell Biol*, 11(3), 228-234. doi: 10.1038/ncb0309-228
- Yuan, S., Tang, H., Xing, J., Fan, X., Cai, X., Li, Q., . . . Wang, W. (2014). Methylation by NSun2 represses the levels and function of microRNA 125b. *Mol Cell Biol*, 34(19), 3630-3641. doi: 10.1128/MCB.00243-14
- Yue, Y., Liu, J., & He, C. (2015). RNA N6-methyladenosine methylation in post-transcriptional gene expression regulation. *Genes Dev*, 29(13), 1343-1355. doi: 10.1101/gad.262766.115
- Zhang, G., Huang, H., Liu, D., Cheng, Y., Liu, X., Zhang, W., . . . Chen, D. (2015). N6-methyladenine DNA modification in *Drosophila*. *Cell*, 161(4), 893-906. doi: 10.1016/j.cell.2015.04.018
- Zhang, S., & Cui, W. (2014). Sox2, a key factor in the regulation of pluripotency and neural differentiation. *World J Stem Cells*, 6(3), 305-311. doi: 10.4252/wjsc.v6.i3.305
- Zhao, R., Russell, R. G., Wang, Y., Liu, L., Gao, F., Kneitz, B., . . . Goldman, I. D. (2001). Rescue of embryonic lethality in reduced folate carrier-deficient mice by maternal folic acid supplementation reveals early neonatal failure of hematopoietic organs. *J Biol Chem*, 276(13), 10224-10228.
- Zhao, S., Nichols, J., Smith, A. G., & Li, M. (2004). SoxB transcription factors specify neuroectodermal lineage choice in ES cells. *Mol Cell Neurosci*, 27(3), 332-342. doi: 10.1016/j.mcn.2004.08.002
- Zhu, H., Cabrera, R. M., Wlodarczyk, B. J., Bozinov, D., Wang, D., Schwartz, R. J., & Finnell, R. H. (2007). Differentially expressed genes in embryonic cardiac tissues of mice lacking *Folr1* gene activity. *BMC Dev Biol*, 7, 128. doi: 10.1186/1471-213X-7-128

## 11.- MATERIAL SUPLEMENTARIO (ANEXOS)

### 11.1.- ANEXO I.- Composición de soluciones

- Solución Ringer pH 7.40 (120mM NaCl, 1mM CaCl<sub>2</sub>, 4mM KCl, 0.8mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.01mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) filtrado con membrana de 0.22um en quitasato
- Buffer para PCR 10x con MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen)
- Isopropanol
- dNTPS
- Taq polimerasa (Invitrogen)
- Morfolinos de Splincing acoplados a Fluoresceina contra FOLR1 (FolR1spMO) y RFC1 (RFCspMO) (GeneTools)
- Primer Forward *Folr1sp* y *Rfc1sp* (Invitrogen)
- Primer Reverse *Folr1sp* y *Rfc1sp* (Invitrogen)
- Loading Buffer 6x con Orange G
- Marcador de peso molecular 100pb 1KbPlus
- Metanol 25%, 50%, 75%, 100% en PBS-DEPC
- Metanol 25%, 50%, 75%, 100% en PBS
- Solución de lavado post hibridación (Formamida 50%, 1.3X SSC-DEPC pH5 con ácido cítrico, 5mM EDTA pH 8.0, 0.2%Tween-20, 0.1% CHAPS-DEPC)
- Solución Mix de Hibridación (Formamida 50%, 1.3X SSC-DEPC pH5 con ácido cítrico, 5mM EDTA pH 8.0, 200ug/ml tRNA, 0.2%Tween-20, 0.1% CHAPS-DEPC, 100ug/ml sal de heparina de sodio)

- Solución de bloqueo de hibridación (10% Boehringer blocking reagent en 1X MAB)
- 10XPBS pH 7.2 (10mM NaHPO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 137mM NaCl, 2mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2.7mM KCl)
- 1X PBS-DEPC (1XPBS+0.1%DEPC)/ 1X PBSt-DEPC (1XPBS-DEPC + 0.1%Tween-20)
- MAB 5X pH7.5 (500mM ácido maleico, 750mM NaCl, 1M NaOH)
- MABT (1XMAB+0.1%Tween-20)
- NTMT (100mM NaCl, 100mM Tris-Cl pH9.5, 50mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1%Tween-20)
- NBT/BCIP en NTMT (1ml NTMT+4.5ul NBT+3.5ul BCIP)
- 20XSSC pH 5.0 con ácido cítrico (NaCl, Citrato de Sodio)
- Anticuerpo anti-dioxigenina acoplado con fosfatasa alcalina
- Sondas antisentido Sox10, Sox2 marcadas con dioxigenina
- Kit RNAqueous Isolation Kit (Ambion)
- Buffer 5x DNase I, DNase I (Invitrogen),
- EDTA 25mM
- Random Primers,
- 5X First Strand Buffer
- 0.1M DTT
- RNase Out (40U/ul),
- SuperScript II RT (1U/ul) (Invitrogen)

- Buffer de Extracción para ADN (100mM Tris-HCl pH8.5, 5mM EDTA, 200mM NaCl and 0.2% SDS)
- Fenol:Cloroformo:Alcohol Isoamílico (25:24:1), Etanol 75%, Isopropanol
- Proteinasa K 20mg/ml
- Azul de metilo 0.04% c/s DEPC,
- TBSt (tween20 0.1%) c/s DEPC pH 7.6, TBSt+5% leche c/s DEPC pH 7.6,
- Anticuerpo primario monoclonal de anti-5 metilcitosina (5mC) (abcam) dilución 1:500 en TBSt+5% leche pH 7.6.
- Anticuerpo secundario acoplado con fosfatasa alcalina Goat anti Mouse (abcam) 1:10000 en TBSt+5% leche pH 7.6
- Solución de bloqueo TBSt+5% leche pH 7.6
- Anticuerpo primario monoclonal Rabbit anti-6 metil adenosina (6mA) (abcam) dilución 1:500 en TBSt-DEPC + 5% leche pH 7.6
- Anticuerpo secundario acoplado con fosfatasa alcalina Goat anti rabbit (abcam) 1:10000 en TBSt-DEPC + 5% leche pH 7.6
- Solución de Bloqueo TBSt-DEPC+5% leche pH 7.6
- NBT/BCIP promega,
- Buffer fosfatasa (Tris-HCl pH 9.5 100mM, NaCl 100mM, MgCl 5mM)
- TBS-T (0.1% Triton 100)
- Anticuerpo primario Rabbit anti FITC (abcam)
- Anticuerpo secundario Alexa Fluor Goat anti Rabbit 488 (abcam)
- Buffer TBE10x, Bromuro de Etidio

## 11.2.- ANEXO II.- ImageJ: imágenes y valores de cuantificación ADN y ARN

### 11.2.1.- Cuantificación de ADN

**TABLA N°6 Datos sin procesar obtenido en el ImageJ (Azul de metileno)**

Azul de metileno ADN 5mC											
Experimt	ng	Area		Media		Max		IntDen		RawIntDen	
		Control	Tratado	Control	Tratado	Control	Tratado	Control	Tratado	Control	Tratado
RFC	0	0.546	0.546	2045.334	1869.504	7781	6566	1117.432	1021.371	10298256	9412951
	20	0.546	0.546	2222.549	2055.28	8365	8455	1214.251	1122.866	11190536	10348337
	40	0.546	0.546	2403.437	2295.397	95548	10562	1313.076	1254.05	12101306	11557323
	80	0.546	0.546	2942.669	3050.478	10709	10162	1607.676	1666.575	14816340	15359159
FoIR1	0	0.546	0.546	1960.31	1829.862	7136	6566	1070.981	847.693	9570163	8812339
	20	0.546	0.546	1980.245	1551.607	7560	7226	1081.872	999.713	9970536	9213353
	40	0.546	0.546	2125.384	2445.766	13196	9650	1161.166	1336.201	10701306	11314432
	80	0.546	0.546	2550.005	3091.897	8963	13733	1393.151	1689.204	12839276	14567701

**TABLA N°6 Datos sin procesar obtenidos en el ImageJ (NBT/BCIP)**

NBT/BCIP ADN 5mC											
Experiment	ng	Area		Media		Max		IntDen		RawIntDen	
		Control	Tratado	Control	Tratado	Control	Tratado	Control	Tratado	Control	Tratado
RFC	0	0.558	0.558	836.427	786.169	3766	4059	466.951	438.893	4303419	4044837
	20	0.558	0.558	4083.799	3240.187	12587	9074	2279.855	1473.3	21011148	13577935
	40	0.558	0.558	4618.369	3531.314	15320	10016	2578.289	1808.893	23761511	16670761
	80	0.558	0.558	4741.202	2639.054	16757	12735	2624.863	1971.42	24393486	18168609
FoIR1	0	0.558	0.558	1150.809	834.818	6167	3628	642.46	466.053	592091	4295141
	20	0.558	0.558	3145.064	1976.627	11048	10259	1755.789	1103.488	16181355	10169745
	40	0.558	0.558	5098.931	3287.348	16456	12607	2846.571	2035.222	24234000	19913407
	80	0.558	0.558	5516.254	5284.774	17297	15419	3079.546	2850.321	28381125	26190161



**TABLA N°7 Datos Azul de metileno**

**5mC procesados**

RawIntDen finales Azul de Metileno 5mC			
	ng ADN	Control	Tratado
<b>RFC</b>	0	0	0
	20	892280	935386
	40	1803050	2144372
	80	4518084	5946208
<b>FoIR1</b>	0	0	0
	20	400373	401014
	40	1131143	2502093
	80	3269113	5755362

**TABLA N°8 Datos NBT/BCIP**

**5mC procesados**

RawIntDen finales NBT/BCIP 5mC			
	ng ADN	Control	Tratado
<b>RFC</b>	0	0	0
	20	16707729	9533098
	40	19458092	12625924
	80	20090067	14123772
<b>FoIR1</b>	0	0	0
	20	15589264	5874604
	40	23641909	15618266
	80	27789034	21895020

11.2.2.- Cuantificación de ARN

**TABLA N°9 Datos sin procesar obtenido en el ImageJ (Azul de metileno)**

Azul de metileno ARN m6A											
Experti.	ng	Área		Media		Max		IntDen		RawIntDen	
		Control	Tratado	Control	Tratado	Control	Tratado	Control	Tratado	Control	Tratado
RFC	0	0.561	0.561	777.527	777.53	3126	3126	436.094	436.094	4019038	4019038
	15	0.561	0.561	997.773	1102.9	4260	4598	559.623	618.566	5157489	5700708
	30	0.561	0.561	1338.54	1399.5	5172	5190	750.751	784.956	6918918	7234152
	60	0.561	0.561	1767.46	2152.3	7081	6622	991.321	1207.242	9136010	11125021
FoIR1	0	0.561	0.561	777.527	777.53	3126	3126	436.094	436.094	4019038	4019038
	15	0.561	0.561	1282.97	870.28	7056	3685	719.581	488.118	5631662	5498493
	30	0.561	0.561	1446.93	1685.5	4992	6678	811.541	945.356	7479160	8712398
	60	0.561	0.561	1993.27	2362.7	5794	9445	1117.971	1325.15	10303234	12212581

**TABLA N°10 Datos sin procesar obtenido en el ImageJ (NBT/BCIP)**

NBT/BCIP ARN m6A											
Experiment	ng	Área		Media		Max		IntDen		RawIntDen	
		Control	Tratado	Control	Tratado	Control	Tratado	Control	Tratado	Control	Tratado
RFC	0	0.461	0.461	351.5	351.5	1725	1725	162.096	162.096	1493875	1493875
	15	0.461	0.461	2778.67	2078.5	7847	7784	1281.397	958.509	10809352	8833616
	30	0.461	0.461	3095.87	2397	10964	6571	1427.719	1105.393	13157858	10187303
	60	0.461	0.461	3225.66	1734.6	9594	5262	1487.527	799.928	13709049	7372138
FoIR1	0	0.461	0.461	351.5	351.5	1725	1725	162.096	162.096	1493875	1493875
	15	0.461	0.461	1985.36	1304.5	6195	6008	915.555	601.563	8437758	5544008
	30	0.461	0.461	3837.05	2214.9	11116	8067	1769.472	1021.396	13307457	9413185
	60	0.461	0.461	4037.33	3537.1	11879	11879	1878.436	1631.141	17311670	15032598

**TABLA N°7 Datos Azul de metileno**

**5mC procesados**

RawIntDen finales Azul de Metileno m6A			
	ng ADN	Control	Tratado
<b>RFC</b>	0	0	0
	15	1138451	1681670
	30	2899880	3215114
	60	5116972	7105983
<b>FoIR1</b>	0	0	0
	15	1612624	1479455
	30	3460122	4693360
	60	6284196	8193543

**TABLA N°8 Datos NBT/BCIP**

**5mC procesados**

RawIntDen finales NBT/BCIP m6A			
	ng ADN	Control	Tratado
<b>RFC</b>	0	0	0
	15	9315477	7339741
	30	11663983	8693428
	60	12215174	5878263
<b>FoIR1</b>	0	0	0
	15	6943883	4050133
	30	11813582	7919310
	60	15817795	13538723